

Eksperimentalni i teorijski opis vitamina C

Podravski, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:314638>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ema Podravski

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Ema Podravski

Predala je izrađen diplomski rad dana: 20. veljače 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. sc. Vladimir Dananić, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Iva Movre Šapić, Fakultet kemijskog inženjerstva
i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Mirela Leskovic, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 23. veljače 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ema Podravski

Eksperimentalni i teorijski opis vitamina C

DIPLOMSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vladimir Dananić

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Vladimir Dananić

doc. dr. sc. Iva Movre Šapić

doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović

prof. dr. sc. Mirela Leskovac (zamjena)

Zagreb, veljača 2023.

SAŽETAK

Eksperimentalni i teorijski opis vitamina C

Cilj ovog rada je pregled teorije vitamina C te izrada infracrvenog spektra za pet različitih uzoraka koji sadrže vitamin C. Prikazana su strukturna, fizikalna i kemijska svojstva ovog vitamina. Sprječava bolest skorbut pa se naziva askorbinska kiselina. Vitamin je L-enantiomer molekule. Gotovo je planarni peteročlani laktonski prsten s postraničnim lancem. Ima mogućnost reverzibilne oksidacije do dehidroaskorbinske kiseline i stvaranja relativno stabilnih slobodnih radikala te može djelovati kao sakupljač slobodnih radikala u reakcijama koje uključuju reaktivne oksidacijske vrste (ROS). Nasuprot tome, u nekim slučajevima može djelovati i prooksidativno. Albert Szent-Györgyi je 1928. godine izolirao molekulu vitamina C, a stvarnu strukturu je 1933. godine razradio Norman Haworth, nakon čega je Tadeus Reichstein objavio i patentirao komercijalno izvedivu metodu sinteze iz glukoze. Navedene su brojne funkcije i važnost kod biljaka, životinja i ljudi. Sudjeluje u zaštiti drugih antioksidansa, pomaže tijelu da apsorbira željezo, može inaktivirati i neutralizirati histamin te ima ulogu u imunološkom sustavu. Povezuje se sa zaštitom lipida, DNK i proteina od oksidansa te djeluje u mnogim mono- i dioksigenezama za održavanje metala u reduciranom stanju. Neophodan je za ispravno odvijanje fotosinteze te može kontrolirati diobu, produljenje i diferencijaciju stanica, kao i programiranu staničnu smrt. Navedene su količine vitamina C u prehranbenim izvorima te dnevne potrebe kod ljudi za sve uzraste. Kod većih doza ne dolazi do potpune apsorpcije, a velik dio apsorbirane doze se ne metabolizira i izlučuje urinom. Glavni metaboliti askorbinske kiseline u organizmu su dehidroaskorbinska kiselina, 2,3-diketo-gulonska kiselina i oksalna kiselina. Dostupne su brojne analitičke metode za opis vitamina C od kojih je u ovom radu korištena infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom. Vitamin C ima mnoge primjene u medicini te prehranbenoj, kemijskoj i kozmetičkoj industriji.

Ključne riječi: vitamin C, askorbinska kiselina, askorbat, dehidroaskorbinska kiselina

ABSTRACT

Experimental and theoretical description of vitamin C

The aim of this paper is to review the theory of vitamin C and to create an infrared spectrum for five different samples containing vitamin C. The structural, physical and chemical properties of this vitamin are presented. It prevents the disease scurvy, which is why it got the name ascorbic acid. Vitamin is the L-enantiomer of the molecule. It is an almost planar five-membered lactone ring with a side chain. In addition to the possibility of reversible oxidation to dehydroascorbic acid, it can form relatively stable free radicals and can act as a scavenger of free radicals in reactions involving reactive oxidizing species (ROS). On the other hand, in some cases it can also act as a pro-oxidant. Albert Szent-Györgyi isolated the vitamin C molecule in 1928, and the actual structure was worked out by Norman Haworth in 1933, after which Tadeus Reichstein published and patented a commercially viable method of synthesis from glucose. Numerous functions and importance in plants, animals and humans are listed. It participates in the protection of other antioxidants, helps the body to absorb iron, can inactivate and neutralize histamine and plays a role in the immune system. Further, it is associated with the protection of lipids, DNA and proteins from oxidants and acts in many mono- and dioxygenases to maintain metals in a reduced state. It is necessary for the proper development of photosynthesis and can control the division, elongation and differentiation of cells, as well as programmed cell death. Amounts of vitamin C in food sources and daily requirements for people of all ages are listed. With larger doses, complete absorption does not occur, and a large part of the absorbed dose is not metabolized and is excreted in the urine. The main metabolites of ascorbic acid in the body are dehydroascorbic acid, 2,3-diketo-gulonic acid and oxalic acid. Numerous analytical methods are available for the description of vitamin C, of which infrared spectroscopy with Fourier transformation was used in this work. Vitamin C has many applications in medicine as well as in the food, chemical and cosmetic industries.

Keywords: vitamin C, ascorbic acid, ascorbate, dehydroascorbic acid

How I love you, Vitamin C
bouncer of the body's toxicity
firming up the skin, we see
speeding neural signals over synapses..
so that we more quickly see

O Anna Niemus

Veliko hvala mentoru, izv. prof. dr. sc. Vladimiru Dananiću na prijedlogu teme, provedenim izračunima i podršci prilikom izrade diplomskog rada.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na potpori i poticaju kojima su priveli izradu ovog rada kraju te me doveli do završetka studija.

Za kraj, ostavljam poruku koju sam dobila prilikom završetka osnovne škole kao daljnju motivaciju i zahvalu sebi što nisam odustala:

Svi naši snovi mogu se ostvariti, ako ih imamo hrabrosti slijediti!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. Vitamin C.....	2
2.1. Strukturna, fizikalna i kemijska svojstva.....	2
2.2. Otkriće.....	7
2.3. Funkcije i važnost	9
2.4. Sinteza.....	13
2.5. Izvori i prehrambene potrebe	16
2.6. Probava: apsorpcija i katabolizam	18
2.7. Analiza	20
2.7.1. FTIR spektroskopija.....	20
2.8. Primjena	23
2.8.1. Medicina	23
2.8.2. Prehrambena industrija	26
2.8.3. Kemijska industrija	26
2.8.4. Kozmetička industrija.....	26
2.8.5. Sport.....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
4. REZULTATI.....	29
5. RASPRAVA	33
6. ZAKLJUČAK.....	34
7. POPIS SIMBOLA.....	35
8. LITERATURA	36

1. UVOD

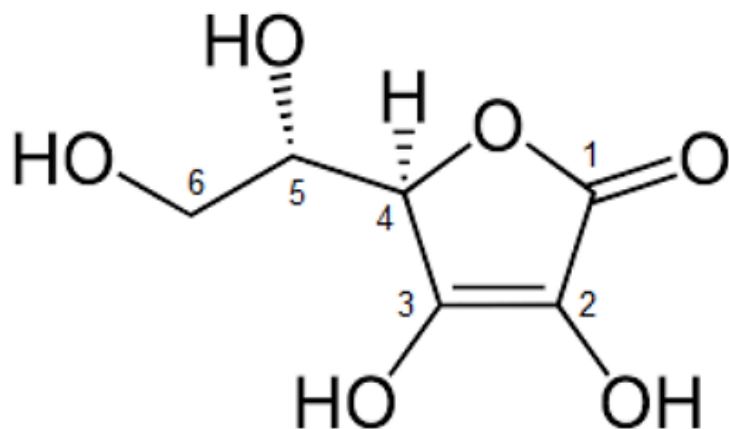
Vitamini su organski spojevi potrebni kao nutrijenti koji imaju važnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja.¹ Glavne zdravstvene organizacije navode 13 vitamina: vitamin A (trans-retinoli, trans-retinil-esteri, trans-beta-karoteni i drugi provitamin A karotenoidi), vitamin B1 (tiamin), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (niacin), vitamin B5 (pantotenska kiselina), vitamin B6 (piridoksin), vitamin B7 (biotin), vitamin B9 (folna kiselina ili folat), vitamin B12 (kobalamini), vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin D (kalciferoli), vitamin E (tokoferoli i tokotrienoli), te vitamin K (filokinon i menakinon).² Vitamini su općenito tvari koje ljudsko tijelo ne može proizvesti iz drugih sastojaka prehrane. Vitamin D je iznimka, ali općenito se tretira kao vitamin. Dok se većina vitamina može dobiti putem prehrambenih izvora, količine u mnogim dijetama nisu dovoljno visoke za optimalno zdravlje. Stoga ih je često korisno dobiti putem dodataka prehrani.¹ Nedostaci vitamina variraju od dobro definiranih bolesti do niza nejasnih simptoma. Neki vitamini pružaju prototipsku strukturu iz koje su medicinski kemičari razvili lijekove koji se koriste za liječenje bolesti koje nisu povezane s nedostatkom tog vitamina. Gornje razine doziranja utvrđene su za one vitamine koji mogu biti potencijalno toksični ako se kronično prekomjerno uzimaju. Vitamini se tradicionalno klasificiraju u dvije skupine: topljivi u mastima i topljivi u vodi. Također se mogu klasificirati prema funkciji: ligandi za receptore, kofaktori i antioksidansi.³

Vitamin C je primjer hranjive tvari koju ljudi ne mogu proizvesti, ali mnoge druge životinje mogu.¹ Jedan je od najvažnijih redoks kofaktora u biljnim i životinjskim sustavima, izvrstan je antioksidans, olakšava redukcijsko-oksidacijske reakcije te ima sposobnost stvaranja relativno stabilnih slobodnih radikala. Važan je za proizvodnju kolagena, vezivnog tkiva i proteinskih vlakana koja daju snagu našim zubima i desnama, mišićima, krvnim žilama i koži. Pomaže tijelu da apsorbira željezo koje nam je potrebno za stvaranje hemoglobina koji prenosi kisik do stanica. Istraživanja su ukazala na ulogu vitamina C u nizu drugih funkcija, poput sinteze hormona i neurotransmitera, kao i u imunološkom sustavu gdje pomaže bijelim krvnim stanicama u borbi protiv infekcije.⁴ Nedostatak uzrokuje bolest skorbut kod ljudi, što rezultira nizom patoloških simptoma, zbog nedostataka u enzimskim koracima i specifičnim procesima. Upravo zbog sposobnosti liječenja i sprječavanja skorbuta, vitamin C se naziva askorbinska kiselina.⁵

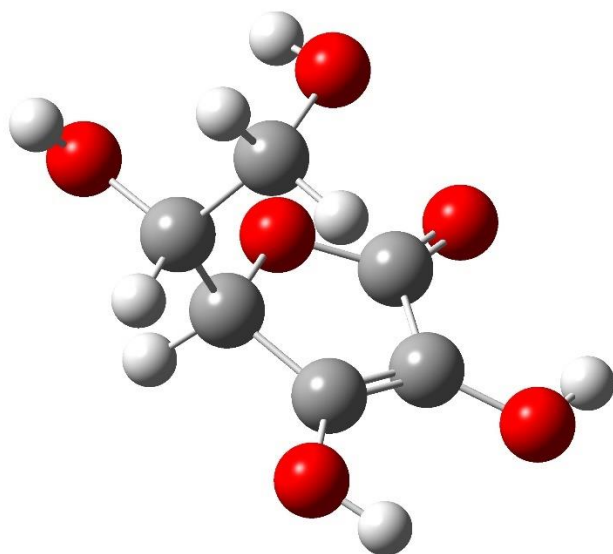
2. Vitamin C

2.1. Strukturna, fizikalna i kemijska svojstva

Vitamin C je L-enantiomer askorbinske kiseline čiji je naziv prema IUPAC-u (2*R*)-2-[(1*S*)-1,2-dihidroksietil]-3,4-dihidroksi-2*H*-furan-5-on.^{6,7} Askorbinska kiselina je gotovo planarni peteročlani (γ) laktonski prsten s postraničnim lancem. (slika 1 i 2)⁸ Ima dva kiralna centra koji rezultiraju s četiri stereoizomera.⁹ Struktura ketolaktona sa 6 ugljikovih atoma slična je strukturi glukoze i ostalim heksozama pa se stoga sintetski dobiva upravo iz D-glukoze. Kristalna struktura je monoklinska s 4 molekule po jednoj jediničnoj ćeliji.^{8,10} Postoje dvije vrste molekula (A i B) u kristalu s osam jasnih međumolekularnih vodikovih veza. Konformacije molekula A i B gotovo su identične s C5-OH antiperiplanarnim u odnosu na C4-H i C6-OH.¹⁰



Slika 1. Struktura L-askorbinske kiseline⁸



Slika 2. Optimirana geometrija molekule vitamina C

Fizikalna svojstva askorbinske kiseline prikazana su u tablici 1. Ima molekularnu masu od 176,13 g mol⁻¹, gustoću od 1,65 g cm⁻³, vrlo je topiva u vodi (>30 g na 100 ml) i različito topiva u većini kratkolančanih alkohola i glikola (1-5 g na 100 ml).⁹ Askorbinska kiselina slaba je dvoprotonska kiselina koja ima jaka reducirajuća svojstva. Njezina kisela svojstva u vodenoj otopini proizlaze iz disocijacije OH skupine na C3 atomu. Forma askorbinske kiseline u vodi uvelike ovisi o pH. Pri pH manjim od pK_a OH skupine na C3 atomu koji iznosi 4,17, askorbinska kiselina u formi je kiseline (H₂Asc), pri pH između 4,17 i 11,57, što je pK_a OH skupine na C2 atomu, nalazi se u formi aniona (HAsc⁻), a pri pH većem od 11,57 nalazi se u formi dianiona (Asc²⁻).^{5,10}

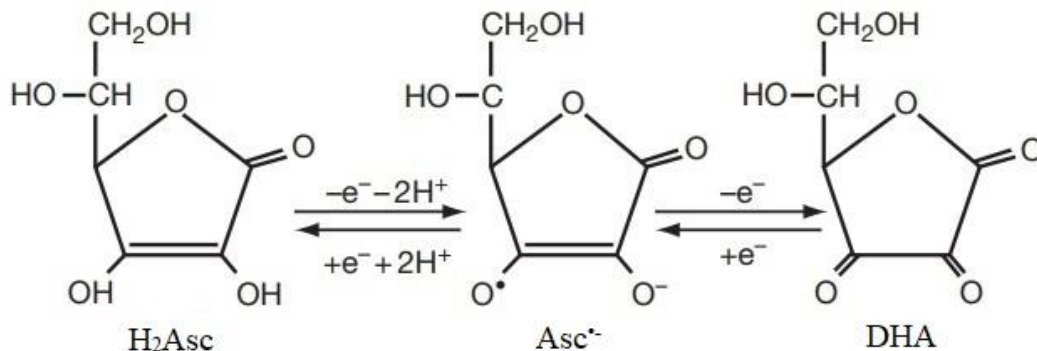
U krutom stanju, kao bijeli prašak, dosta je stabilna, dok u vodi dolazi do oksidacije zbog otopljenog kisika, a oksidaciju dodatno pojačavaju metalni ioni, najviše željezo i bakar te alkalije. Stoga je treba čuvati u plastičnim bocama, zaštićenu od svjetlosti i zraka.⁵

Reakcije razgradnje L-askorbinske kiseline u vodenim otopinama ovise o nizu čimbenika kao što su pH, temperatura, prisutnost kisika ili metala. Općenito, askorbinska kiselina nije vrlo stabilna u vodenom mediju na sobnoj temperaturi, gdje se može raspasti unutar nekoliko sati ili čak minuta pri visokom pH (>10,0). Nasuprot tome, askorbinska kiselina je relativno stabilna u krvi (dan ili više) ako se čuva u kiselom pH (<3,0) ili ispod -20 °C (često tjednima do mjesecima).^{5,9} Iznad pH 7,0, razgradnja katalizirana alkalijama dovodi do preko 50 spojeva, uglavnom mono-, di- i trikarboksilnih kiselina. Vitamin se može stabilizirati u biološkim uzorcima trikloroetenom kiselinom ili metafosfornom kiselinom.^{5,11}

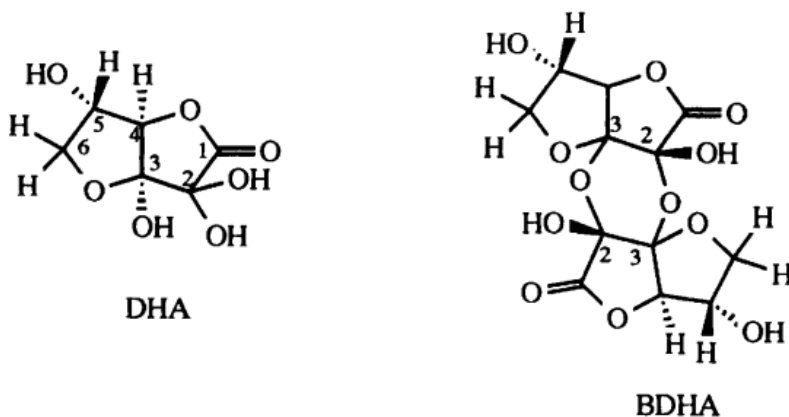
Tablica 1. Fizikalna svojstva askorbinske kiseline^{5,10}

empirijska formula	C ₆ H ₈ O ₆
relativna molekulska masa	176,13
gustoća	1,65 g cm ⁻³
talište	190-192 °C
pH	~3 pri 5 mg mL ⁻¹ ~2 pri 50 mg mL ⁻¹
pK _a	4,17 (C3-OH) 11,57 (C2-OH)
specifična rotacija	[α] _D ²⁰ = +23° u vodi [α] _D ²⁰ = +49° u metanolu
toplјivost (g/100 cm ³ pri 20°C)	33 (voda) 3 (etanol) 1 (glicerol) netoplјiva u kloroformu, benzenu, eteru i mastima
redoks potencijal	-174 mV (DHA/Asc ²⁻) +282 mV (Asc ⁻ , H ⁺ /Asc ²⁻)
apsorpcijski spektar	E _{max} (1%, 10 mm) 695 na 245 nm pri pH 2 E _{max} (1%, 10 mm) 940 na 265 nm pri pH 6.4

Najvažnije kemijsko svojstvo vitamina C je reverzibilna oksidacija askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu (slika 3).⁹ Oksidirani oblik askorbinske kiseline, dehidroaskorbinska kiselina, zadržava aktivnost vitamina C i može postojati kao hidratizirani poluketal. Kristalna dehidro-L-askorbinska kiselina može postojati kao dimer (slika 4).^{9,10}



Slika 3. Kemijski oblici askorbinske kiseline⁹



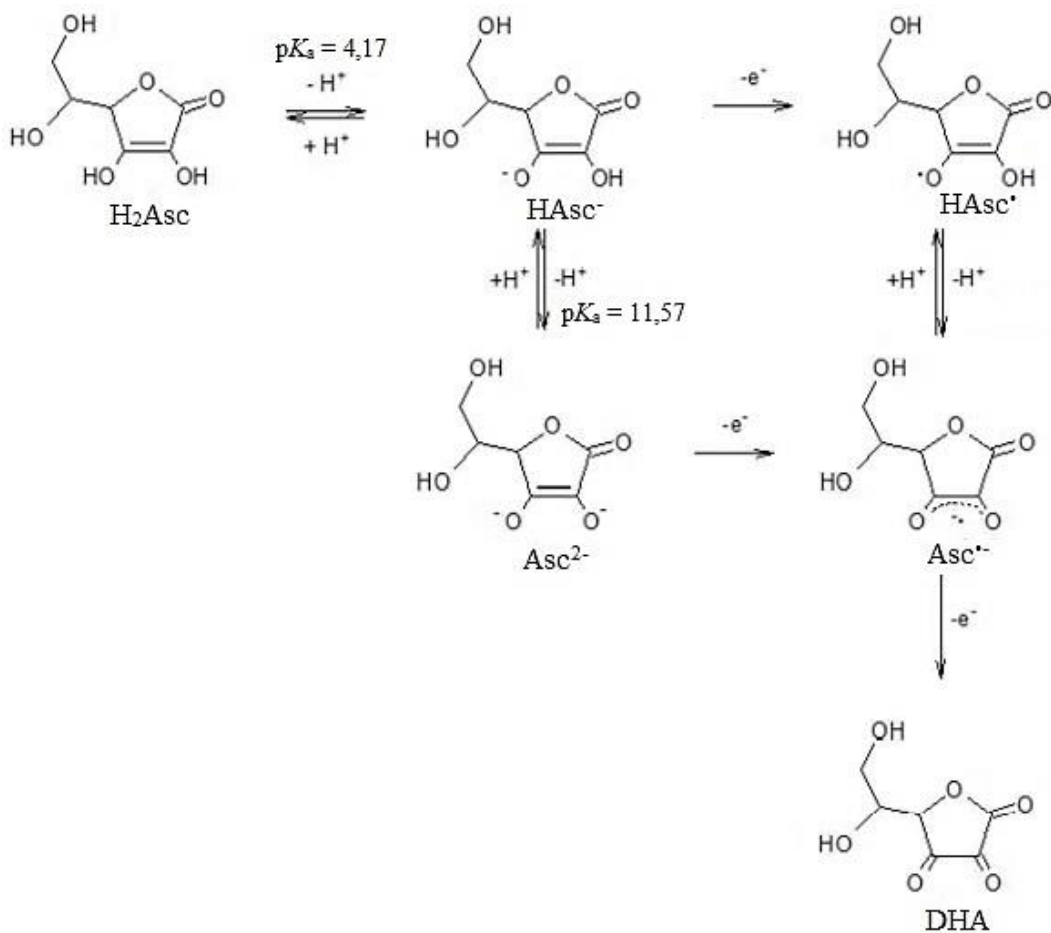
Slika 4. Dehidroaskorbinska kiselina: monomer (DHA) i dimer (BDHA)¹⁰

Osim što olakšava redukcijsko-oksidacijske reakcije, askorbinska kiselina ima sposobnost stvaranja relativno stabilnih slobodnih radikala. Askorbinska kiselina može djelovati kao sakupljač slobodnih radikala u reakcijama koje uključuju reaktivne oksidacijske vrste (ROS).⁹ Askorbatni radikal važan je intermedijer u reakcijama koje uključuju oksidanse i antioksidacijsku aktivnost askorbinske kiseline, jer može značajno odgoditi ili spriječiti oksidacije koje pokreću slobodni radikali.^{5,9} Konstante brzine za stvaranje askorbatnih radikala značajno variraju, ali često diktiraju brzo stvaranje radikala.⁹ Kada askorbatne radikale stvaraju oksianioni, konstante brzine su reda veličine 10^4 - 10^7 s⁻¹, a kada ih stvaraju halogenidni, tokoferolni i flavonoidni radikali 10^6 - 10^8 s⁻¹.^{5,11,12} Jednom formirani, radikali askorbata (Asc^{•-}) relativno se sporo raspadaju procesom disproporcioniranja ($2 \text{ Asc}^{\bullet-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HAsc}^- + \text{DHA}$).^{9,11} Promjena ionske jakosti ili pH može utjecati na brzinu disproporcijacije askorbinske kiseline (povećati ili smanjiti). Određeni oksianioni, na primjer fosfatni, ubrzavaju disproporcijaciju.¹³ Ubrzanje se pripisuje sposobnosti

različitih protoniranih oblika fosfata da učinkovito doniraju proton radikalaskorbata, posebno dimernim oblicima askorbata.⁵

L-askorbinska kiselina može imati direktni i indirektni antioksidativni učinak u organizmu. Antioksidativni učinak *in vivo* postiže se pomoću redoks para askorbinska kiselina/dehidroaskorbinska kiselina. Ovaj redoks sustav je složen, a uzrok tomu je što na svaki redoks proces u kojem sudjeluje askorbinska kiselina utječe prijenos protona jer različita oksidacijska stanja askorbinske kiseline imaju različita kiselobazna svojstva. Taj sustav prikazan je na slici 5 s pripadajućim pK_a vrijednostima.¹⁰

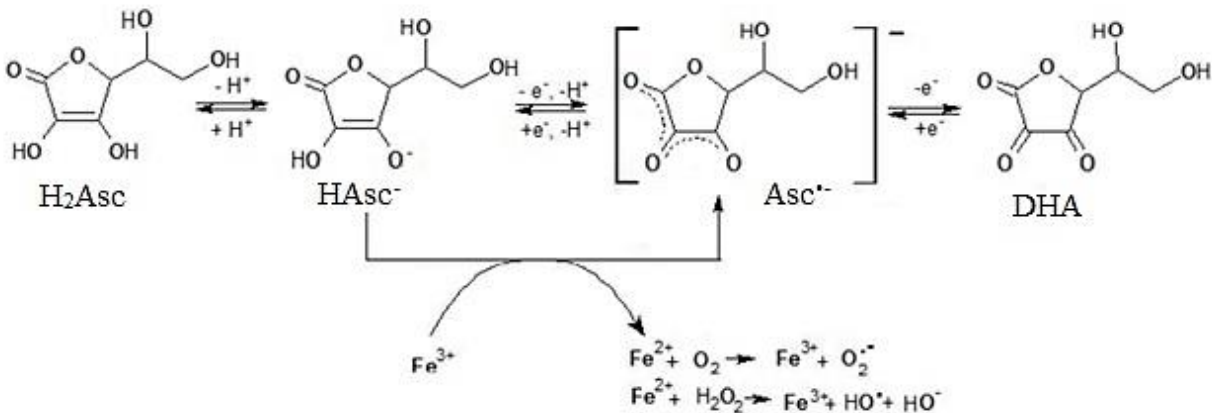
Otpuštanjem elektrona na C3 atomu askorbata nastaje L-askorbinski slobodni radikal. Dalje, otpuštanjem drugog elektrona na C2 atomu nastaje dehidroaskorbinska kiselina. Askorbil radikal i dehidroaskorbinska kiselina mogu se ponovno reducirati u askorbat. Neki od enzima koji sudjeluju u recikliranju askorbata su NADH-citokrom *b*₅-reduktaza, askorbat radikal reduktaza, tioredoksin reduktaza, koji reduciraju askorbil radikal, dok glutation, glutaredoksin i tioredoksin reduktaza reduciraju dehidroaskorbinsku kiselinu.¹⁰



Slika 5. Redoks sustav L-askorbinske kiseline¹⁰

Askorbinska kiselina lako hvata reaktivne vrste kisika i dušika, kao što su superoksidni, hidroperoksidni, peroksinitritni i nitroksidni radikali. HAsc[•] donira atom vodika (H[•] ili H⁺ + e⁻) oksidirajućem radikalu čime nastaje slobodni radikal trikarbonil askorbat stabiliziran rezonancijom. HAsc[•] ima pK_a od -0,86; prema tome, nije protoniran. Nadalje, nespareni elektron Asc^{•-} se nalazi u π-sustavu koji uključuje trikarbonilni dio askorbata. To je slabo oksidirajući i reducirajući radikal. Zbog svog π-karaktera, Asc^{•-} ne reagira s kisikom te time ne stvara peroksidne radikale koji mogu dovesti do štetnih oksidacija. Relativno je nereaktivan s potencijalom redukcije jednog elektrona od samo +282 mV, i kao takav se smatra terminalnim malo molekulskim antioksidansom.⁹

Nasuprot tome, askorbinska kiselina u visokim dozama može djelovati prooksidativno kao i u aerobnim uvjetima kada su prisutni i metali sposobni za redoks (Fe²⁺ ↔ Fe³⁺; Cu⁺ ↔ Cu²⁺).^{5,9,14} Mehanizam je prikazan na slici 6.¹⁵ Askorbinska kiselina nema direktan prooksidativni učinak, već uzrokuje redukciju trovalentnog željeza u divalentno koje potom reagira s kisikom ili vodikovim peroksidom, pri čemu se željezo ponovo oksidira u trovalentno pa nastaju superoksidni radikal, odnosno hidroksilni radikal. Ti radikali mogu uzrokovati oksidativni stres i lipidnu peroksidaciju.¹⁶



Slika 6. Prooksidativni mehanizam djelovanja askorbinske kiseline¹⁵

U biološkim sustavima, neobična stabilnost askorbatnog radikala zahtjeva da dodatni enzimski sustavi budu dostupni kako bi se smanjilo potencijalno nakupljanje askorbatnog radikala. Višak askorbatnih radikala može pokrenuti kaskadne reakcije slobodnih radikala ili nespecifične oksidacije. U biljkama je NADH-monodehidroaskorbat reduktaza evoluirala da održava askorbinsku kiselinu u reduciranom obliku. NADH-monodehidroaskorbat reduktaza igra važnu ulogu u odgovorima biljaka na stres. U životinjskim tkivima u tu svrhu služi glutathion dehidroaskorbat reduktaza. Takvi enzimi održavaju maksimalnu učinkovitost vitamina C, tako da drugi enzimski sustavi mogu iskoristiti jednovalentni kapacitet redoks ciklusa askorbata.^{5,17}

2.2. Otkriće

Uobičajeni naziv za bolest koja je posljedica dugotrajnog nedostatka vitamina C u prehrani je skorbut. Skorbut u svojim najtežim fazama utječe na kolagenom povezane potporne strukture i može dovesti do lezija kože i krvarenja iz sluznice. Kod uznapredovalog skorbuta može doći do gnojnih rana, gubitka zuba i psihičkih promjena.⁴ Bolest se oduvijek povezivala osobito s osobama koje dugo žive u stresnim uvjetima, a najčešće s nautičarima nakon najmanje 10 tjedana na moru. Također je 1800. prihvaćeno da sokovi od citrusa (npr. limuna i naranče) uz salate i drugu svježu zelenu hranu svi imaju vrijednost u zaštiti mornara od skorbuta, ali nažalost, svi su bili nestabilni i podložni truljenju prilikom dulje pohrane na brodu pri vrućem vremenu prije razvoja hlađenja.¹⁸

U 1900-ima bilo je moguće proizvesti eksperimentalni model skorbuta na prikladnom laboratorijskom životinjskom modelu, zamorcu. Dvojicu norveških medicinskih istraživača zapravo je zanimalo problem zašto se kod skandinavskih mornara ponovno javlja druga bolest, beri-beri, iako im je prehrana navodno poboljšana. Proizveli su bolest hraneći životinje prehranom temeljenom na bijeloj (poliranoj) riži. Na njihovo veliko iznenađenje, iako su sve životinje uginule, njihove obdukcije pokazivale su jasne znakove skorbuta, a ne beri-berija. Nakon što je to potvrđeno, pokazalo se da se stanje može ublažiti istom hranom koja djeluje protiv ljudske bolesti, npr. sokom od limuna i kupusom. Ogromno značenje ovog otkrića bilo je to što će kemičari sada moći sustavno frakcionirati hranu i moći karakterizirati najaktivnije frakcije biološkim testom. Zapadnoeuropske vlade su počele uviđati vrijednost potpore medicinskim istraživanjima, koja su u Britaniji započela otprilike u vrijeme Prvog svjetskog rata.¹⁸

Ono što danas poznajemo kao vitamin C prvi je izolirao u Cambridgeu 1928. godine mađarski znanstvenik Albert Szent-Györgyi (1893.–1986.), pokušavajući izolirati spoj za koji se zna da je u relativno visokoj koncentraciji u kori nadbubrežne žlijezde i da djeluje kao snažno redukcijsko sredstvo u biokemijskim sustavima. Uspio je pokazati da ima empirijsku formulu $C_6H_8O_6$ koja je donekle slična jednostavnim šećerima s formulom $C_6H_{12}O_6$. Urednik časopisa nazvao ju je 'heksuronska kiselina' jer je bila kiselina i 'heks-' jer je imala 6 ugljikovih atoma, a jednostavni šećeri sa 6 atoma ugljika također su se nazivali 'heksozama' gdje je završetak '-oza' općenito prihvaćeni izraz za šećere.¹⁸ Kasnije je naziv promijenjen u askorbinska kiselina, jer se pokazalo da je tvar istovjetna s aktivnim čimbenikom u lijeku za životinje oboljele od skorbuta.⁸ Szent-Györgyi bio je u mogućnosti dovršiti ovaj rad nevjerojatno brzo zahvaljujući svom in vitro testu (redukcija jako obojenog joda u bezbojne jodidne ione trajala je samo nekoliko minuta, za razliku od testova sa zamorcima koji su trajali nekoliko tjedana) i, naravno, zbog vlastitih vještina u laboratoriju.¹⁸

Sljedeći korak bio je razraditi stvarnu strukturu vitamina, tj. kako su atomi međusobno povezani unutar molekule, a to je postignuto na Sveučilištu u Birminghamu, UK, 1933. godine s timom koji je vodio Norman Haworth (1883–1950). Švicarski tim Tadeusa Reichsteina je zatim objavio i patentirao komercijalno izvedivu metodu sinteze tako da je sintetski vitamin postao prilično jeftin te dostupan. Budući da je imao i prilično ugodan okus, počeo se konzumirati u velikim količinama.

Utvrđeno je da vrlo malo životinjskih vrsta treba vitamin C u svojoj prehrani. Ostale ga trebaju u svojim tkivima, ali ga mogu same proizvesti oksidacijom glukoze.¹⁸ Važno je podsjetiti da evolucijska pojava sposobnosti biosinteze askorbata u vodozemaca sugerira da je veća potreba za askorbatom možda bila povezana s prelaskom iz vodenog u kopneni način života, gdje su se suočili s većim oksidacijskim stresom i vrućom klimom.¹⁹ Čini se da su naši daleki preci u jednom trenutku, u vrijeme kada su imali unos vitamina koji je u potpunosti zadovoljio njihove kasnije potrebe, kao rezultat mutacije izgubili sposobnost sintetiziranja askorbinske kiseline. Točnije, čini se da je enzim koji smo izgubili gulonolakton oksidaza koja obavlja posljednji korak u pretvorbi (dehidrogenaciji) produkata razgradnje glukoze u samu askorbinsku kiselinu. U suprotnom bi oni koji nisu mutirali bili u prednosti i prevladali.¹⁸

Danas se u bogatijim zemljama više ne bi trebali pojavljivati slučajevi skorbuta. Više nema razloga da ljudi na dugim ekspedicijama i izvan dodira s civilizacijom obole od skorbuta, iako se procjenjuje da je čak 2 milijuna mornara bolovalo i umrlo od ove bolesti u prošlosti.¹⁸

Djelomično zbog otkrića vezanog uz vitamin C, Albert Szent-Györgyi (slika 7) i Walter Norman Haworth (slika 8) dobili su 1937. Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu, odnosno kemiju.²⁰



Slika 7. Albert Szent-Györgyi (1893-1986)²⁰



Slika 8. Walter Norman Haworth (1883-1950)²⁰

2.3. Funkcije i važnost

Slobodni radikali, uključujući hidroksi, hipokorit, peroksi, alkoksi, superoksid, vodikov peroksid i singletni kisik nastaju autooksidacijom, zračenjem ili djelovanjem nekih oksidaza, dehidrogenaza i peroksidaza. Dodatni izvori slobodnih radikala su duhanski dim, hiperoksični zrak, otapala, pesticidi i određeni zagađivači, uključujući ozon. Slobodni radikali mogu biti izuzetno štetni za biološke sustave.¹⁹ Zbog svojstva reverzibilne oksidacije L-askorbinska kiselina sudjeluje u brojnim biološkim oksido-redukcijskim procesima. Može direktno reagirati i ukloniti mnoge vrste slobodnih radikala čime štiti stanice od oštećenja oksidansima.⁹

Glavna obrana stanice od slobodnih radikala i drugih oksidativnih oštećenja uključuje antioksidativne vitamine poput askorbata i α -tokoferola, enzime poput katalaze i superoksid dismutaze te spojeve poput glutaciona.¹⁹

Vitamin C sudjeluje u zaštiti drugih antioksidansa kao što je vitamin E. Askorbinska kiselina može regenerirati njegov reducirani oblik, α -tokoferol.^{10,19} Askorbinska kiselina, α -tokoferol i β -karoten (prekursor vitamina A) izvrsni su antioksidansi i hranjive tvari. Regulira funkciju folne kiseline (vitamina B9) koja je neophodna za pravilno funkcioniranje organizma jer sudjeluje u proizvodnji i popravku genetičkog materijala (DNK), umnožavanju stanica, pomaže u sazrijevanju eritrocita i doprinosi zdravlju krvnih žila i srca te je neizmjerljivo važna za prevenciju urođenih defekata kod djece. Folna kiselina, da bi bila funkcionalna, mora biti u reduciranom obliku, u obliku tetrahidrofolne kiseline. Vitamin C pomaže tijelu da apsorbira željezo. Željezo je potrebno za stvaranje hemoglobina, crvenog pigmenta u krvi, koji prenosi kisik iz pluća u ostatak tijela, a bolje se apsorbira u dvovalentnom stanju, nego u trovalentnom, pa ga je poželjno uzimati uz vitamin C.¹⁰ U krvi i drugim izvanstaničnim tekućinama, vitamini C i E glavni su antioksidansi. Askorbat također može inaktivirati i neutralizirati histamin koji aktivira upalni odgovor.¹⁹ Ima ulogu u imunološkom sustavu tako što utječe na proizvodnju protutijela, povećava brzinu stvaranja limfocita i povećava mobilnost leukocita.¹⁰

Askorbinska kiselina, zajedno s glutationom, važan je ne-enzimski antioksidans u odjeljku stanica topljivom u vodi. Antioksidativno djelovanje glutaciona i askorbata usko je povezano i uključuje mehanizme u kojima smanjeni glutacioni može čak stimulirati sintezu askorbinske kiseline u onih životinja koje je mogu proizvesti. Tijekom postnatalnog razvoja dolazi do brze promjene jer se životinje prilagođavaju iz relativno hipoksične na relativno hiperoksičnu okolinu. U tom smislu, jedna od mnogih funkcija glutaciona je održavanje askorbinske kiseline u reduciranom obliku. Adekvatan unos askorbinske kiseline osobito je važan kod novorođene mladunčadi koja još nema potencijal za sintezu askorbata. U odraslih životinja koje mogu stvarati askorbinsku kiselinu, smanjenje razine glutaciona može dovesti do brzog porasta dehidroaskorbinske kiseline u jetri. Nedostatak askorbinske kiseline i glutaciona može uzrokovati patološke promjene u jetri i drugim organima.⁹

Askorbinska kiselina se često povezuje sa zaštitom lipida, DNK i proteina od oksidansa. Štiti od oštećenja peroksidacijom lipida, na primjer, kada se peroksilni radikali stvaraju u plazmi, vitamin C se troši brže od drugih antioksidansa (npr. mokraćne kiseline, bilirubina i vitamina E). Askorbinska kiselina je 10^3 puta reaktivnija od polinezasićene masne kiseline u reakciji s peroksilnim radikalima. Nasuprot tome, askorbinska kiselina nije tako učinkovita u uklanjanju hidroksilnih ili alkoksilnih radikala. Pokazalo se da askorbinska kiselina pruža određeni stupanj zaštite u odnosu na oksidaciju DNK. Oksidativno oštećenje DNK je od posebne važnosti u somatskim stanicama, zbog rizika od mutacija, koje mogu dovesti do raka ili urođenih mana. Primjeri oksidacije proteina uključuju cjeloživotnu oksidaciju dugotrajnih proteina, kao što je kristalin u očnoj leći, oksidaciju inhibitora α -proteinaze i napredne krajnje produkte glikacije povezane s dijabetesom. Iako su podaci ograničeni, čini se da dodatak askorbinske kiseline ima zaštitni učinak od oksidacije proteina i DNK.^{5,9}

Nagađalo se da bi u procesu staničnog disanja vitamin C mogao funkcionirati kao ciklički redoks par u fenomenu prijenosa elektrona i potenciranja membrane te bi mogao imati istu vrstu statusa koji se trenutno dodjeljuje citokromu *c*.¹⁰

Askorbinska kiselina djeluje u mnogim mono- i dioksidogenazama za održavanje metala u reduciranom stanju. Mono- i dioksidogenaze obično sadrže bakar ili željezo kao redoks kofaktore. Dioksidogenaze zahtijevaju α -ketoglutarat i O_2 kao kosupstrate u reakcijama, dok mono-oksigenaze zahtijevaju samo O_2 . Važne reakcije i procesi koji uključuju mono- i dioksidogenaze su:

– *Sinteza norepinefrina*

Norepinefrin (noradrenalin) je organski spoj u porodici kateholamina, koji funkcionira u mozgu i tijelu kao hormon (prekursor adrenalina) i neurotransmiter. Sinteza norepinefrina ovisi o askorbinskoj kiselini što dijelom objašnjava potrebu za visokom koncentracijom askorbinske kiseline u moždanom tkivu i nadbubrežnim žlijezdama. Askorbinska kiselina je kofaktor potreban u biosintezi kateholamina i u nadbubrežnoj steroidogenezi (proces nastajanja steroida). Dopamin β -hidroksilaza, prisutna u granulama za pohranu kateholamina u živčanim tkivima kao i u kromafinskim stanicama srži nadbubrežne žlijezde, katalizira posljednji korak koji ograničava brzinu u sintezi norepinefrina. Dopamin β -hidroksilaza je tetramer koji sadrži dva Cu^+ iona po monomeru koji stehiometrijski troši askorbat s O_2 tijekom svog reakcijskog ciklusa. U stabilnom stanju, prevladavajući oblik enzima je kompleks enzim-produkt. Primarna funkcija askorbata je održavanje bakra u reduciranom stanju u ovom kompleksu. Čini se da je samo reducirani enzim katalitički kompetentan, s vezanim bakrovim ionima kao jedinim rezervoarom redukcijskih ekvivalenata. Pod akutnim stresom, razine askorbinske kiseline u živčanom tkivu također se brzo smanjuju.^{5,9,19}

– *Aktivacija hormona*

Mnogi od peptidnih hormona i faktora koji otpuštaju hormone sintetiziraju se kao prekursorske molekule koje se nakon niza modifikacija pretvaraju u svoje aktivne oblike. Jedan takav završni odnosno posttranslacijski korak aktivacije je α -amidacija, koja je potrebna za biološku snagu peptida. Primjeri α -amidiranih peptida uključuju melanotropine, kalcitonin, oslobađajuće faktore za hormon rasta, kortikotropin i tireotropin, pro-ACTH, vazopresin, oksitocin, kolecistokinin i gastrin. Petidilglicin α -amidirajuća mono-oksigenaza, enzim koji provodi α -amidaciju, nalazi se u sekretornim granulama neuroendokrinih stanica u mozgu, hipofizi, štitnjači i submaksilarnim žlijezdama. Askorbinska kiselina služi kao reducens za održavanje bakra u reduciranom stanju na aktivnom mjestu enzima.^{9,19}

– *Biosinteza karnitina*

Karnitin je neophodan za transport energetski bogatih masnih kiselina iz citoplazme u matriks mitohondrija gdje se kataboliziraju β -oksidacijom u acetat. Askorbat je kofaktor za dva koraka hidroksilacije u putu biosinteze karnitina, γ -butirobetain hidroksilaze i ϵ -*N*-trimetilizin hidroksilaze. Nedostatak askorbata dovodi do čak 50% smanjenja karnitina u srcu i skeletnim mišićima kod životinja kojima je potrebna askorbinska kiselina.^{9,10}

– *Biosinteza kolagena*

Askorbinska kiselina je kofaktor za enzime važne za posttranslacijsku modifikaciju proteina izvanstaničnog matriksa i možda regulaciju transkripcije specifičnih proteina. Nedostatak vitamina C različito utječe na ekspresiju kolagena, laminina, različitih integrina stanične površine, kao i elastina. Kao primjer, bit će istaknuta uloga askorbinske kiseline u prolil i lizil hidroksilazi. Sinteza kolagena je razrađen proces sinteze proteina, posttranslacijskih modifikacija, izlučivanja proteina i stvaranja izvanstaničnog matriksa. Pridonoseći gotovo jednoj trećini ukupnih tjelesnih proteina sisavaca, kolagen je dominantan strukturni protein koji se pojavljuje u tetivama, ligamentima, koži, kostima, zubima, hrskavici, srčanim zaliscima, intervertebralnim diskovima, rožnici i lećama uz opću distribuciju tkiva kao izvanstaničnog okvira. Do danas je identificirano 25 (možda i više) različitih tipova polipeptidnih lanaca kolagena. Različite vrste kolagena razlikuju se po svojim relativnim količinama hidroksiprolina i hidroksilizina. Ne postoje kodoni za hidroksiprolin (Hyp) i hidroksilizin (Hyl), a kada se kolagen sintetizira, prolin (Pro) i lizin (Lys) se hidroksiliraju posttranslacijski na rastućem polipeptidnom lancu. Svaki od ovih lanaca okuplja se u različite fibrilarne ili laminarne strukture. Vlakna kolagena počinju se sastavljati u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevim kompleksima. Da bi polipeptidni lanci formirali stabilne strukture, specifični ostaci u svakom lancu moraju biti hidroksilirani. Hidroksilacija prolina i lizina važna je u sklapanju kolagena i sazrijevanju u vlakna. Odgovarajuće hidroksilaze kataliziraju hidroksilaciju prolilnih i lizilnih ostataka u kolagenu. Askorbinska kiselina je važan kofaktor koji održava željezni ion vezan za enzim u reduciranom stanju čime enzim ostaje aktivan. Reducirano željezo potrebno je za koordinaciju s kisikom. Kada su vlakna kolagena nedovoljno hidroksilirana, unutarstanično sastavljanje kolagenih vlakana je ugroženo, s mogućim promjenama u distribuciji i vrstama

poprečnih veza. Rezultat je prekomjerna razgradnja i izmjena kolagena. Fiziološke posljedice kreću se od otežanog zacjeljivanja rana, modrica do krhkosti kapilara, obilježja skorbuta. Važna je perspektiva da neki kolageni imaju vrlo dug poluživot i da su razvojno regulirani. Posljedično, ako se skorbut pojavi u kritičnim vremenima razvoja, mogu postojati vrlo duboke i dugotrajne posljedice koje utječu na taloženje kosti, modeliranje vaskularnog i plućnog alveolarnog matriksa. Budući da je kolagen glavni protein vezivnog tkiva u tijelu, neophodan je za sve faze normalnog rasta, razvoja i oporavka. U biljkama, prolil hidrosilaza hidrosilira ostatke prolina u staničnim stijenkama hidrosiprolinom bogatih glikoproteina koji su potrebni za diobu i širenje stanica. Otprilike 50 proteina koji sadrže hidrosiprolin identificirano je u virusima i bakterijama, gdje askorbinska kiselina također može igrati ulogu kofaktora.^{5,9,19}

Askorbinska kiselina nalazi se u kvascima i prokariotima, osim u cijanobakterijama.⁵ Značajan dio dostupne glukoze (oko 1%) koristi se za proizvodnju vitamina C, koji je u visokim koncentracijama prisutan u biljkama. Vitamin C pronađen je u svim odjeljcima stanice, uključujući apoplast (staničnu stijenku i izvanstanični prostor), dosegnuvši koncentraciju od 20 mM u kloroplastima. Sadržaj vitamina C značajno se razlikuje među biljnim vrstama i u istoj vrsti između različitih kultivara. Štoviše, sadržaj vitamina C varira među različitim tkivima i organima, obično je visok u lišću, meristemskim tkivima, cvjetovima ili mladim plodovima, a nizak u nefotosintetskim organima kao što su stabljike i korijenje. Samo sjemenke koje sazrijevaju u fazi jake dehidracije (ortodoksne sjemenke) sadrže malo vitamina C, koji je uglavnom u oksidiranom obliku. U istom organu ili tkivu na sadržaj vitamina C utječu stadij razvoja biljke i promjene okoliša. Svjetlost je jedan od najznačajnijih signala iz okoliša uključenih u regulaciju razine vitamina C. Kao i kod ljudi, vitamin C pogoduje unosu željeza u biljkama.²¹ Ima različite funkcije u kloroplastima, neophodan je za ispravno odvijanje fotosinteze: ima ključnu ulogu u izravnom uklanjanju ROS-a i u uklanjanju H₂O₂, sudjeluje u ksantofilnom ciklusu, koji je potreban za zaštitu od fotoinhibicije, djeluje u regulaciji redoks stanja fotosintetskih prijenosnika elektrona i kao kofaktor za violaksantin de-epoksidazu, enzim uključen u fotozaštitu posredovanu ksantofilnim ciklusom. Promjene u sadržaju vitamina C značajno modificiraju ekspresiju gena povezanih s fotosintezom. Smanjenje sadržaja askorbata, dovodi do gubitka klorofila a, smanjenja RUBISCO velike podjedinice i smanjenja asimilacije CO₂. Vitamin C, očuvanjem fotosintetskog funkcioniranja i ograničavanjem oštećenja uzrokovanih ROS-om, usporava starenje lišća. Askorbinska kiselina također služi kao kofaktor u metaboličkim putevima važnim za etilen, gibereline i antocijane.^{9,21} Složena međuigra između vitamina C i signalizacije hormona intervenira u različitim fazama rasta i razvoja biljke, kao i u odgovoru biljke na okoliš i patogene. U biljkama vitamin C može kontrolirati diobu, produljenje i diferencijaciju stanica, kao i programiranu staničnu smrt. Ovaj metabolit u diobi stanica korijenskih meristema može skratiti G1 fazu i stimulirati ulazak u S fazu. Stanice obogaćene askorbatom pokazuju stimulaciju stanične diobe, dok obogaćivanje dehidroaskorbatom dovodi do smanjenja stanične diobe, što sugerira da je reducirano stanje temeljno za napredovanje staničnog ciklusa. Vitamin C, regulirajući gore navedene procese na molekularnoj i staničnoj razini, uključen je u različite faze rasta i razvoja biljaka, kao što su sazrijevanje i klijanje sjemena, cvjetanje, sazrijevanje plodova i starenje.²¹

2.4. Sinteza

Za mnoge biljke i životinje askorbinska kiselina nije vitamin jer je produkt izravne oksidacije D-glukoze (ili galaktoze i manoze, ne može se sa sigurnošću utvrditi točan mehanizam). Proces je ovisan o glikogenolizi; glukoza potrebna za proizvodnju askorbata ekstrahira se iz glikogena. Kod sisavaca i ptica stanarica biosinteza se odvija u jetri, a kod gmazova i ptica u bubrezima.²² Slijed reakcija vode enzimi. Kod životinja, ključan enzim u ovom procesu je L-gulonolakton oksidaza, koja katalizira završni korak u sintezi askorbinske kiseline, odnosno gulono-1,4-lakton se oksidira u askorbinsku kiselinu. U životinja koje ne mogu ili ne proizvode dovoljno askorbinske kiseline, mutacije u genu L-gulonolakton oksidaze dogodile su se prije 50-60 milijuna godina. U skladu s tim, ovim je životinjama potreban prehrambeni izvor askorbinske kiseline. Ljudi, drugi viši primati (majmuni), mali broj drugih sisavaca (npr. zamorci i šišmiši) te neke vrste ptica i riba je ne mogu sintetizirati.⁹

Askorbinska kiselina može se sintetizirati iz različitih ugljikohidrata, npr. L-sorboze, L-sorbitola, D-glukuronske kiseline, L-gulonske kiseline, ali najvažniji polazni spoj je D-glukoza.²³ Pristup koji se koristi za sintezu askorbinske kiseline često ovisi o konačnoj upotrebi finalnog proizvoda.²⁴ Većina pristupa u stvaranju ili modificiranju askorbinske kiseline uključuje derivatizaciju. Selektivna derivatizacija askorbinske kiseline može biti teška zbog delokalizacije negativnog naboja askorbata u njegovom anionskom obliku. Na primjer, zaštitom C2 i C3 hidroksilne skupine, alkilacija ili acilacija može se odvijati na sterički dostupnijoj primarnoj hidroksilnoj skupini na C6. Reakcije na položaju C5 događaju se tek nakon završetka derivatizacije C2, C3 i C6. Stvaranje acetata ili ketala askorbinske kiseline korisno je za zaštitu molekule dok se provode reakcije na drugim ugljikima.⁵

Godine 1933. švicarska skupina Tadeusa Reichsteina izvijestila je o sintezi, iz D-ksilozona, supstance koja je bila identična prirodnoj askorbinskoj kiselini osim svoje specifične rotacije. Točna kemijska struktura askorbinske kiseline tada im nije bila poznata (dapače, svom su proizvodu pripisali netočnu strukturu) i ubrzo je postalo jasno da su zapravo sintetizirali D-izomer vitamina. Kasnije te iste godine, Norman Haworth i Edmund Hirst, naoružani svojim znanjem o pravoj strukturi askorbinske kiseline, objavili su da su uspjeli izvršiti sintezu prirodne tvari. Kao početni materijal koristili su L-ksilozon, mukotrpno pripremljen od D-galaktoze sintetskim putem koji uključuje osam koraka, a zatim su upotrijebili isti reakcijski slijed od tri stupnja kao švicarski kemičari. Sinteza askorbinske kiseline iz C₅ šećera sada je dobro uspostavljena, a ksiloza, liksoza i arabinoza se koriste kao prekursori.¹⁰

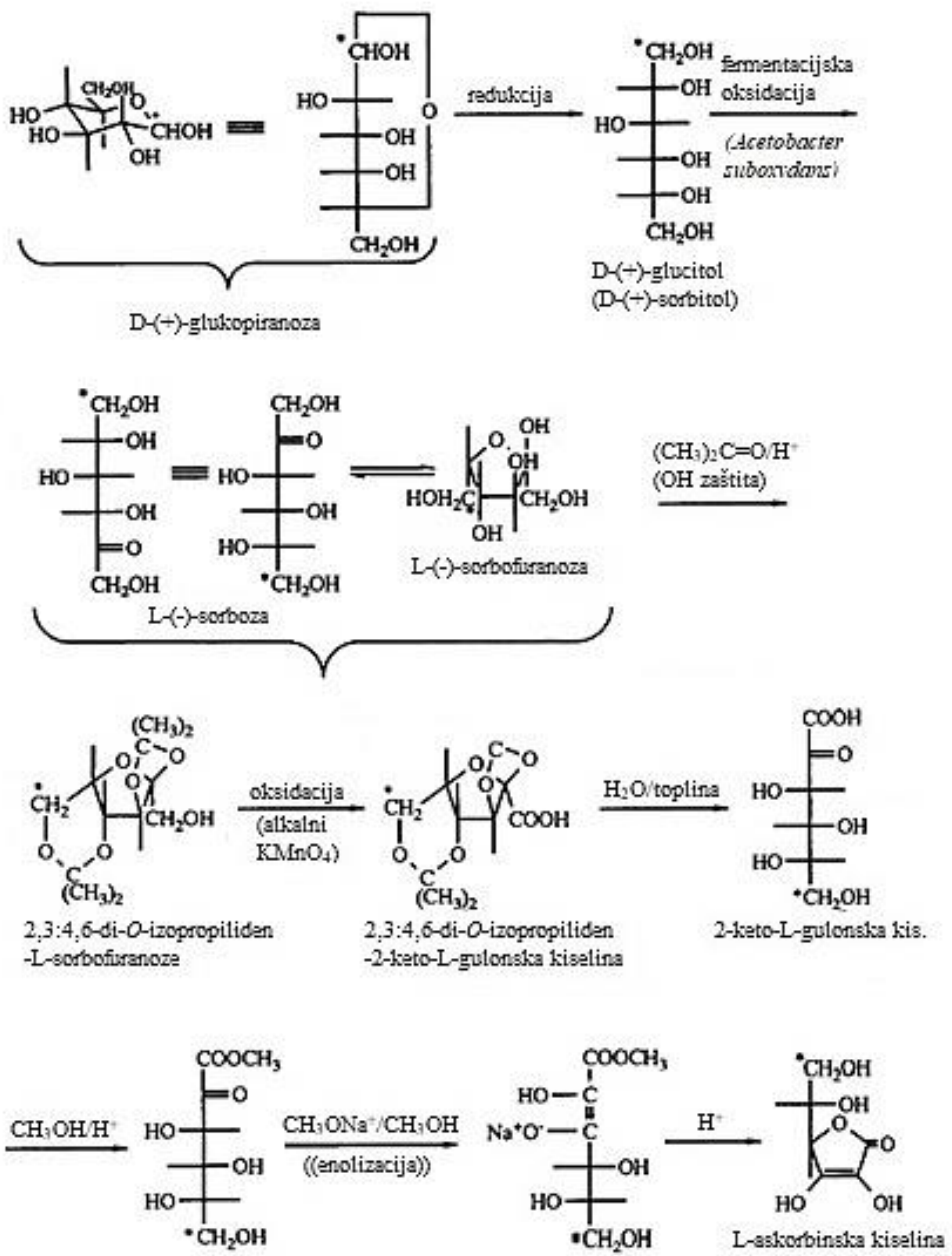
Otprilike godinu dana kasnije, Reichstein i Grussner opisali su novi put do L-askorbinske kiseline iz C₆ šećera D-(+)-glukoze (slika 9). Ovo je i dalje najvažnija sintetska metoda koja je dosad osmišljena za vitamin C i, uz neke izmjene, još uvijek predstavlja temelj procesa za njegovu komercijalnu proizvodnju. Reichstein je u suradnji s farmaceutskim divom Hoffman-La Roche naknadno prijavio niz patenata za proizvodnju vitamina C koji su se u konačnici pokazali vrlo unosnim. Proces je uključivao redukciju D-glukoze u D-glucitol (D-sorbitol) koji je zatim

fermentacijski oksidiran u L-sorbozu s *Acetobacter suboxydans* (ili *Acetobacter xylinurn*). Di-*O*-izopropilidenilna zaštita hidroksi skupina na ugljicima 2,3 i 4,6 omogućila je glatku oksidaciju C1 primarnog alkohola s kalijevim permanganatom. Deprotekcija, esterifikacija i enolizacija (s natrijevim metoksidom) praćena zakiseljavanjem dala je askorbinsku kiselinu u prinosu od 15-18%. Pažljivim razmatranjem Reichsteinove sinteze uočava se da C1 molekule prekursora D-glukoze postaje C6 u proizvodu L-askorbinskoj kiselini. Ovo je poznato kao inverzija ugljikovog lanca i zabilježeno je nekoliko daljnjih sintetskih postupaka koji uključuju sličnu glukoznu C1/C6 inverziju. Put ugljika C1 glukoze označen je zvjezdicom na slici 9.¹⁰

U industrijskom proizvodnom procesu, redukcija u D-sorbitol se postiže ili elektrolitički ili katalitičkim hidrogeniranjem ($H_2/CuCrO_2$). Dodatno, otkriveno je da reakcija sorboze sa zakiseljenim acetonom na niskoj temperaturi ($-5^\circ C$) daje znatno povećani prinos di-*O*-izopropilidena. Oksidacija ove zaštićene sorboze (2,3:4,6-di-*O*-izopropiliden-L-sorbofuranose ili 'diaceton sorboze') u odgovarajuću 2,3:4,6-di-*O*-izopropiliden-2-keto-L-gulonsku kiselinu (ili 'diaceton-keto-gulonsku kiselinu') obično se dobiva upotrebom izbjeljivača (natrijev hipoklorit), proizvedenog na licu mjesta, u prisutnosti katalizatora nikal sulfata. Sada je također utvrđeno da se ova zaštićena kiselina može glatko pretvoriti izravno u askorbinsku kiselinu koristeći efektivne nevodene uvjete (npr. kloroform-etanol, koncentrirana klorovodična kiselina, $65^\circ C$, 50 sati). Sirova kiselina se zatim izolira, pročišćava dekolorizacijom s aktivnim ugljenom i, konačno, rekristalizira iz vode. Kao rezultat ovih modifikacija, svaki korak u procesu proizvodnje sada daje iskorištenje veće od 90%, što rezultira konverzijom izvorne glukoze većom od 50%.¹⁰

Kako bi se zamijenile višestruke kemijske reakcije u Reichsteinovom procesu razvijen je biokemijski proces fermentacije u dva koraka, koji je sada metoda za industrijsku proizvodnju askorbinske kiseline.²⁵ Proces uključuje upotrebu novog enzima, L-sorbozon dehidrogenaze, koji izravno pretvara polialkohole, kao što je L-sorbozon u L-askorbinsku kiselinu i 2-keto-L-gulonsku kiselinu.⁵ I dalje se nastoji unaprijediti industrijska proizvodnja.²⁵

Trenutna svjetska proizvodnja procjenjuje se na približno 80.000 tona godišnje sa svjetskim tržištem većim od 600 milijuna dolara, a jedan od najvećih proizvođača je upravo tvrtka Roche.²⁶ Zanimljivo, iako je opisano dosta različitih sintetskih postupaka za L-askorbinsku kiselinu otkako su Haworth i Hirst prvi put uspješno izvršili zadatak, svi oni u osnovi spadaju u tri kategorije koje uključuju ili izravnu konverziju prekursora C₆ ili kombinaciju odgovarajućih jedinica C₁ i C₅ ili C₂ i C₄.^{10,27}



Slika 9. L-askorbinska kiselina iz D-glukoze sa inverzijom ugljikovog lanca¹⁰

2.5. Izvori i prehrambene potrebe

Askorbinska kiselina nalazi se u značajnim količinama u povrću, voću i organima životinja kao što su jetra, bubrezi i mozak.⁵ Ljudsko mlijeko sadrži 1-5 mg askorbinske kiseline na 100 g, ovisno o majčinoj prehrani tako da od prestanka dojenja pa do groba ovisimo za vitamin C uglavnom o voću i povrću, osim ako ne uzimamo sintetski dodatak.¹⁰ Tipične vrijednosti u hrani i tkivima dane su u tablici 2.^{5,9} Iako voće i povrće u početku sadrži velike količine askorbinske kiseline, kulinarški tretman koji dobivaju često smanjuje prisutnu količinu prije nego što dođe do potrošača. Biljni materijal bogat askorbinskom kiselinom također sadrži oksidazu askorbinske kiseline koja normalno može biti neaktivna ili sadržana unutar vezikula, a fino usitnjavanje takvog materijala povećava aktivnost enzima. Drugi enzim koji će uzrokovati gubitak askorbinske kiseline u biljnom materijalu je fenolaza. To je tvar koja pomaže u proizvodnji smeđih plodova kao što su jabuke kada polifenolne vrste oksidiraju kisikom iz zraka. Enzim funkcionira s kisikom i askorbinskom kiselinom i reducira orto-kinone natrag u orto-difenole. To rezultira stvaranjem dehidroaskorbinske kiseline, koja se brzo pretvara u 2,3-diketogulonsku kiselinu. Proces kataliziraju bakar(II) i drugi ioni prijelaznih metala, koji stoga ubrzavaju gubitak askorbinske kiseline iz povrća i voća, primjerice kada se kuhaju u bakrenim ili željeznim posudama. Naravno, glavni faktor u uklanjanju vitamina C iz kuhanog povrća je jednostavno otapanje u vodi za kuhanje.¹⁰

Većina sisavaca kojima je potrebna askorbinska kiselina zadovoljava svoje potrebe pri unosu od 20-80 mg na 1000 kcal (4,184 MJ). Ova količina odgovara onome što se može ekstrapolirati iz sintetskih stopa kod životinja koje proizvode askorbinsku kiselinu.⁹

Potrebe za vitaminom C kod ljudi (date kao raspon za žene–muškarce i izražene kao preporučeni dnevni unos (RDA) ili odgovarajući unos (AI)) su sljedeće: dojenčad, 40 mg d⁻¹ (AI na temelju onoga što je prisutno u ljudskom mlijeku); djeca (3–13 godina), 15–45 mg d⁻¹ (ekstrapolirano iz RDA za odrasle); adolescencija, 45–65 mg d⁻¹; odrasli (>19 godina), 75–90 mg d⁻¹; dojilje, 115–120 mg d⁻¹.⁹ RDA za vitamin C iz 2000., 75–90 mg dnevno, predstavlja povećanje od 25%-50% u odnosu na RDA iz 1989., 60 mg.⁵ U skladu s ovim procjenama, neka klinička istraživanja su primijetila nedostatak vitamina C u 2-7% ispitanih pojedinaca. Veća je vjerojatnost da će osobe koje puše imati marginalni status vitamina C u usporedbi s nepušačima. Nekoliko studija pokazuje da je pušačima potrebno više od 200 mg vitamina C dnevno kako bi održali koncentraciju vitamina C u plazmi na razini koja je jednaka onoj kod nepušača. Genetske varijacije u transporterima ili enzimima uključenim u metabolizam askorbata također mogu utjecati na funkcije ili koncentraciju vitamina u stabilnom stanju. Posljedično, postoji mogućnost da pojedinci s razlikama u genima imaju veće potrebe za vitaminom C.⁹ Povećane potrebe za vitaminom C uočene su i kod trudnica, alkoholičara, dugotrajnih dijareja, hemodijalize, različitih infekcija, hipertireoidizma, stresa, terapije nekih lijekova itd.¹⁰

Tablica 2. Vitamin C u odabranoj hrani i tkivima^{5,9}

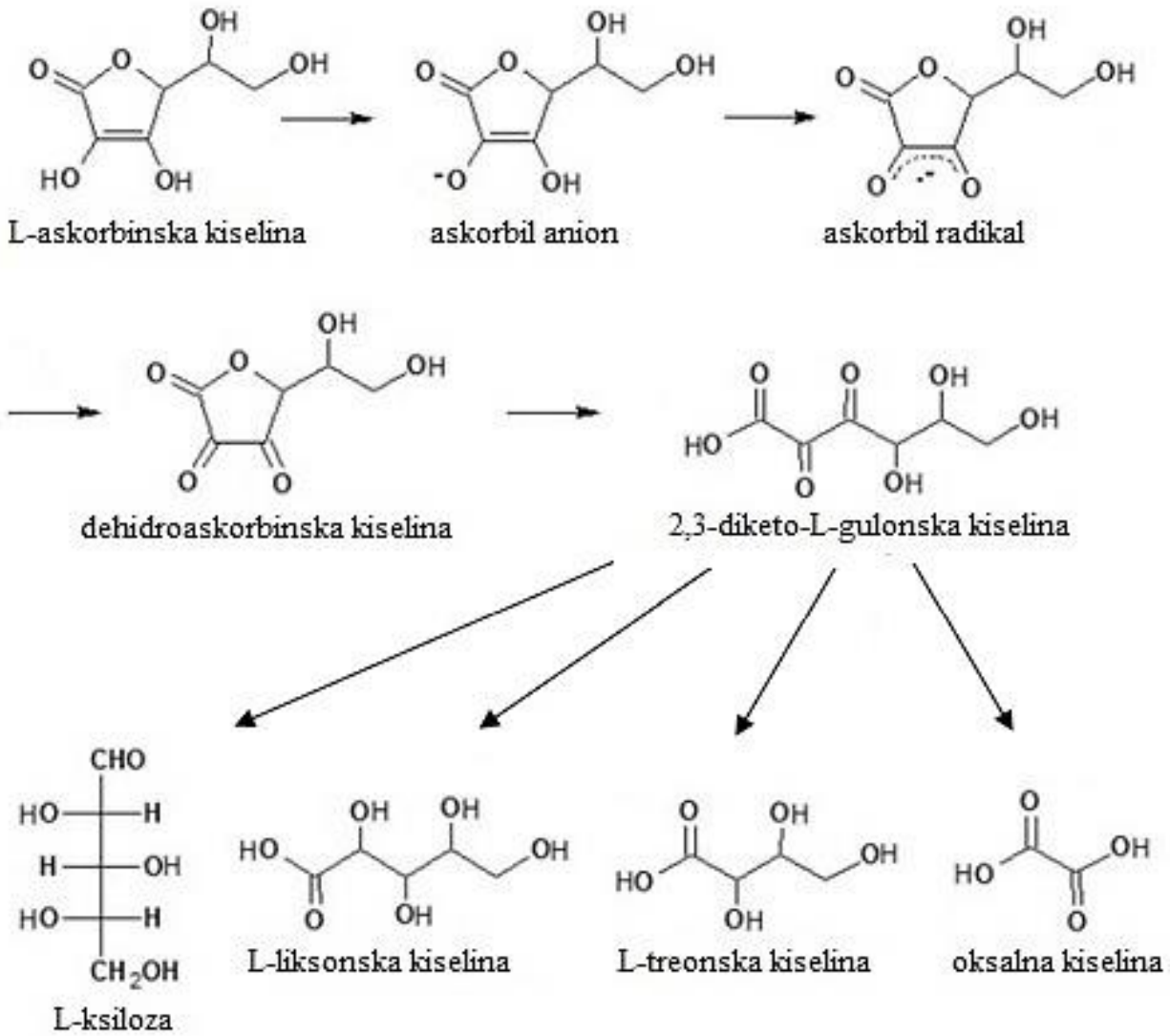
<i>Izvori vitamina C</i>	<i>mg Asc na 100 g mokre težine ili jestive porcije</i>	<i>Izvori vitamina C</i>	<i>mg Asc na 100 g mokre težine ili jestive porcije</i>
životinjski proizvodi		Povrće	
kravlje mlijeko	0.5–2	grah, razni	10–15
ljudsko mlijeko	3–6	brokula	80–90
govedina, svinjetina, teletina	1–2	prokulice	100–120
goveđa, svinjska jetra	10–30	kupus	30–70
pileća jetra	15–20	mrkva	5–10
pileći bubreg	6–8	krastavac, cikla	6–8
pileće srce	5	cvjetača	50–70
kamenica (sirova)	30	patlidžan	15–20
mišić raka	1–4	vlasac	40–50
jastog	3	kelj	70–100
škampi	2–4	luk	10–15
voće		salata, razna	10–30
jabuka	3–30	grašak	8–12
banana	8–16	krumpir	4–30
kupina	8–10	bundeva	15
trešnja	15–30	rotkvica	25
crveni ribiz	20–50	špinat	35–40
crni ribiz	150–200	šparoge	15–30
grejp	30–70	avokado	10
kiwi	80–90	začini	
limun	40–50	cikorija	30–40
limeta, naranča	30–50	korijandar	90
dinja	9–60	češnjak	15–25
jagoda	59–70	hren	50
ananas	15–25	poriluk	15
šipak	250–800	peršin	200–300
rajčica	15–20	papar, razni	150–200

2.6. Probava: apsorpcija i katabolizam

Kada se askorbinska kiselina konzumira u prehrani, ileum i jejunum su glavna mjesta apsorpcije askorbinske kiseline. Bioraspoloživost vitamina C ovisi o dozi. Kod ljudi se zasićenje transporta događa s dozama od 200-400 mg d⁻¹. Otprilike 70% doze od 500 mg se apsorbira. Međutim, velik dio apsorbirane doze (>50%) se ne metabolizira i izlučuje urinom. S dozom od 1250 mg apsorbira se samo 50% doze, a većina (>85%) apsorbirane doze se izluči. Vitamin C nije vezan za proteine i eliminira se s poluvijekom eliminacije od 10-12 sati. Koncentracije vitamina C u plazmi kreću se od 45 do 50 μmol l⁻¹ u dobro uhranjenih osoba s tipičnim unosom vitamina C od 90-100 mg vitamina C dnevno.⁹ Koncentracije vitamina C u plazmi kod ljudi koji redovito uzimaju dodatke vitamina C su 30%-70% više, u rasponu od 50-60 μmol l⁻¹ do 75-80 μmol l⁻¹ kod pojedinaca koji redovito uzimaju dodatke od 100 mg do 500-1000 mg vitamina C.^{5,28} Koncentracije vitamina C u plazmi u novorođenčadi mnogo su više, ~150 μmol l⁻¹.^{5,29} Neka tkiva mogu akumulirati čak 100 puta više od razine askorbinske kiseline u krvi (npr. nadbubrežne žlijezde, hipofiza, timus, žuto tijelo i mrežnica). Koncentracije u tkivu kreću se od mikromolarnih do milimolarnih količina, što znači da se u sustavima sisavaca toleriraju visoke razine vitamina C u tkivima. Međutim, također postoje dokazi da se ubrzani metabolizam ili odlaganje askorbinske kiseline javlja nakon produljene suplementacije visokih doza askorbinske kiseline, odnosno da se razine askorbinske kiseline u tkivima održavaju metabolički kontroliranim ili reguliranim procesima.⁹

Askorbinska kiselina se prenosi u sve vrste stanica. Jednostavna difuzija objašnjava dio ovog kretanja. Glavni prijenos, međutim, odvija se pomoću transportnih proteina koji omogućuju ulazak i izlazak iz stanice. Za askorbat postoje Na⁺ kotransporter koji aktivno prenose askorbat u stanice.³⁰ Budući da je strukturno sličan glukozi, dehidroaskorbat se unosi u stanice putem pomoćnih glukoznih transportera (GLUTs). Do akumulacije askorbinske kiseline u stanicama dolazi pretvaranjem dehidroaskorbata u askorbinsku kiselinu. Ovo također služi održavanju niske unutarstanične koncentracije dehidroaskorbata, što pogoduje unosu u stanicu duž gradijenta koncentracije. Povećanje unutarstanične koncentracije askorbinske kiseline događa se u vrijeme kada je stanici potrebna maksimalna antioksidativna zaštita od produkata vlastitih oksidativnih reakcija. Od kliničkog značaja, dijabetes može utjecati na stanični transport askorbata. Visoka razina glukoze može se natjecati za mjesto u glukoznim transporterima, ometajući unos dehidroaskorbinske kiseline. Uočeno je da aktivnost transportera varira obrnuto s unutarstaničnim askorbatom, što rezultira održavanjem relativno konstantne unutarstanične koncentracije.^{5,25}

Glavni metaboliti katabolizma askorbinske kiseline u organizmu su dehidroaskorbinska kiselina, 2,3-diketo-gulonska kiselina i oksalna kiselina. Metabolizira se najvećim dijelom u jetri, a metaboliti se izlučuju urinom. Askorbinska se kiselina prvo oksidira do askorbil aniona, potom do askorbil radikala te do dehidroaskorbinske kiseline. Dehidroaskorbinska kiselina ireverzibilno se prevodi u 2,3-diketo-gulonsku kiselinu jer dolazi do hidrolize laktonskog prstena. Ona se potom može prevesti u oksalnu kiselinu, L-ksilozu, L-liksonsku kiselinu i L-treonsku kiselinu. Katabolizam je prikazan na slici 10.¹⁰ Oksidacija askorbinske kiseline u CO₂, C₄ i C₅ derivate te izlučivanje glavni su putevi kojima se askorbinska kiselina gubi iz tijela.^{5,30}



Slika 10. Katabolizam askorbinske kiseline¹⁰

2.7. Analiza

Dostupni su brojni pristupi za detekciju askorbinske kiseline. Najčešći pristup uključuje titraciju s oksidirajućim sredstvima. Askorbinska kiselina snažno apsorbira UV svjetlo, što je osnova za neke spektrofotometrijske testove. Redoks svojstva askorbinske kiseline omogućuju elektrokemijsku detekciju ili detekciju interakcije s redoks-osjetljivim kromoforima i bojama.⁹ Elektrokemijska detekcija omogućuje istovremeno mjerenje askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline, izomera i derivata. Sada je razvijen niz metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti za izolaciju askorbinske kiseline. Kromatografski pristupi uključuju ionsku izmjenu, plinsku kromatografiju, kromatografiju obrnutih faza i ionsko sparivanje. U izravnim ispitivanjima askorbinske kiseline u sirovim smjesama često se koristi 2,2'-dipiridil kalorimetrijska metoda koja se temelji na redukciji Fe^{3+} u Fe^{2+} askorbinskom kiselinom. Fe^{2+} reagira s 2,2'-dipiridilom i tvori kompleks koji se može kvantificirati kalorimetrijski. Uz 2,2'-dipiridil, također su korišteni ferozin i Folin fenol reagens. Nadalje, metode temeljene na fluorometrijskoj i kemiluminiscencijskoj detekciji pružaju vrlo osjetljive pristupe za određivanje askorbinske kiseline.⁵ Enzimske metode i masena spektrometrija omjera izotopa također se koriste za detekciju i kvantitativno određivanje askorbinske kiseline.⁹ Enzimske metode koje koriste askorbat oksidazu imaju prednost selektivnog mjerenja biološke aktivnosti askorbinske kiseline.⁵

Važno je napomenuti da prisutnost askorbinske kiseline također može ometati mnoge kemijske testove urina i krvi. Primjeri uključuju analizu glukoze, mokraćne kiseline, kreatinina, bilirubina, glikohemoglobina, hemoglobina A, kolesterola, triglicerida, leukocita i anorganskog fosfata, jer kao reducens, askorbinska kiselina može uzrokovati stvaranje nespecifične boje.⁵

2.7.1. FTIR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija Fourierove transformacije (FTIR) je najčešći oblik infracrvene spektroskopije. Sve infracrvene spektroskopije djeluju na principu da kada infracrveno (IR) zračenje prolazi kroz uzorak, dio zračenja se apsorbira. Bilježi se zračenje koje prolazi kroz uzorak. Budući da različite molekule sa svojim različitim strukturama proizvode različite spektre, spektri se mogu koristiti za identifikaciju i razlikovanje među molekulama. Na taj način, spektri su poput ljudskih otisaka prstiju ili DNK: praktički jedinstveni.³¹

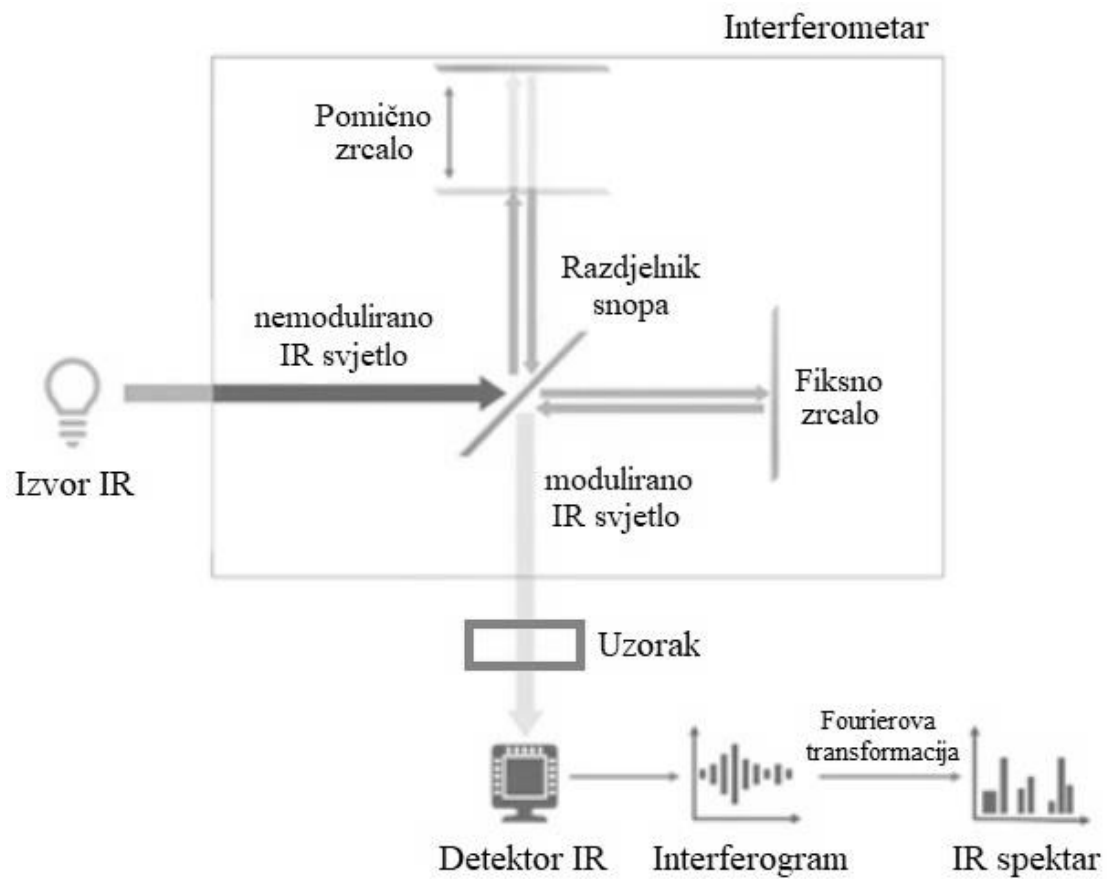
FTIR spektroskopija koristi moduliranu, srednju infracrvenu energiju za ispitivanje uzorka (400-4000 cm^{-1}). Infracrveno svjetlo se apsorbira na određenim frekvencijama koje su izravno povezane s energijama vibracijske veze između atoma u molekuli. Kada su energija vibracije veze i energija srednjeg infracrvenog svjetla ekvivalentne, veza može apsorbirati tu energiju. Različite veze u molekuli vibriraju različitim energijama i stoga apsorbiraju različite valne duljine IR zračenja.³² Vrsta vibracije (rastezanje ili svijanje) izazvana infracrvenim zračenjem ovisi o atomima u vezi.³¹ Položaj (frekvencija) i intenzitet ovih pojedinačnih apsorpcijskih vrpca doprinose cjelokupnom spektru, stvarajući karakterističan „otisak“ molekule.³²

Svi infracrveni (FTIR) spektrometri (slika 11) zahtijevaju tri osnovne komponente: *IR izvor svjetla* koji emitira IR svjetlo, *interferometar* koji vremenski ovisno modificira spektralni sastav IR svjetla i *detektor* koji detektira intenzitet svjetla.

Kada IR svjetlost uđe u interferometar, razdjelnik snopa dijeli svjetlost u dvije optičke zrake. Prvu zraku reflektira nepokretno zrcalo, a drugu zraku reflektira pokretno zrcalo. Ovo zrcalo se stalno pomiče naprijed-natrag i, ovisno o položaju, druga zraka prelazi duži ili kraći put. Dvije zrake ponovno se susreću kod razdjelnika zraka, gdje interferiraju jedna s drugom. Zbog promjene udaljenosti putovanja druge zrake, rezultirajuće IR svjetlo koje izlazi iz interferometra ima stalno promjenjivu distribuciju frekvencije. Detektor bilježi ovaj "interferogram" - funkciju intenziteta signala u odnosu na vrijeme (=položaj zrcala). Računalo Fourierovom transformacijom pretvara interferogram u infracrveni spektar koji prepoznajemo i koristimo - funkciju intenziteta signala u odnosu na frekvenciju/valni broj. Fourierova transformacija je matematička funkcija koja rastavlja valove i vraća frekvenciju vala na temelju vremena. Spektar se bilježi na grafikonu s valnim brojem (cm^{-1}) zabilježenim na X-osi, a transmitancijom (%) zabilježenom na Y-osi. Transmitancija je suprotna apsorpciji, to je udio upadnog zračenja dane valne duljine koji je prošao kroz medij na koji pada zračenje. Valni broj je $1/\text{valna duljina}$ i odgovara energiji vibracije molekularnih veza.^{31,32}

FTIR je preferirana metoda infracrvene spektroskopije iz nekoliko razloga. Prvo, ne uništava uzorak. Drugo, znatno je brža od starijih tehnika.³¹ Za razliku od disperzivnog IR spektrometra, gdje disperzivni element dijeli ulaznu svjetlost na njene spektralne komponente i gdje se svaka komponenta mjeri zasebno, u FTIR-u se sve frekvencije svjetlosti mjere istovremeno.³² Treće, mnogo je osjetljivija i preciznija. Ove prednosti FTIR-a proizlaze iz upotrebe interferometra te Fourierove transformacije.³¹ Jedna od velikih prednosti infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom je ta što pruža i kvalitativne i kvantitativne informacije iz istog izmjerenog FTIR spektra.³²

FTIR spektroskopija se koristi u organskoj sintezi, znanosti o polimerima, petrokemijskom inženjerstvu, farmaceutskoj industriji i analizi hrane. Drugim riječima, ima širok raspon primjena, od razumijevanja strukture pojedinačnih molekula i sastava molekularnih smjesa do identifikacije spojeva i određivanja komponenti u smjesi pa do praćenja procesa.³¹



Slika 11. Shematski prikaz interferometra - središnji dio modernih FTIR spektrometara³²

2.8. Primjena

2.8.1. Medicina

Vitamin C ima vrlo važnu ulogu u farmaceutskoj industriji. Dostupan je u obliku različitih suplemenata, u kombinaciji s drugim vitaminima te u različitim dozama. Studije bioraspoloživosti pokazuju da intravenska primjena proizvodi koncentracije u plazmi koje se nikada ne bi mogle postići oralnom primjenom, za doze od 500 mg i više. Iz perspektive farmakokinetike, to nije iznenađujuće, budući da intravenska primjena mnogih lijekova proizvodi veće vrijednosti u usporedbi s oralnom primjenom, zbog komparativnih ograničenja u crijevnoj apsorpciji. Na primjer, pacijenti s ozbiljnim infekcijama često primaju intravenske umjesto oralne antibiotike, dijelom jednostavno zato što se učinkovite koncentracije obično bolje postižu intravenskim putem. Jednostavno rečeno, askorbinska kiselina primijenjena intravenozno može proizvesti farmakološke koncentracije (ili slične koncentracijama lijeka) zbog ograničene intestinalne apsorpcije. Koncentracije iznad 250 mM ne mogu se proizvesti čak ni uz oralno doziranje od mnogo grama, a više koncentracije mogu se smatrati farmakološkim koncentracijama.²⁵

Osim u prevenciji skorbuta, kao što je ranije opisano, najčešće se koristi u prevenciji prehlade, a isto tako može pomoći i u smanjenju njezinih simptoma. U tu svrhu koristi se dnevna doza od 1-2 g. Visoka koncentracija vitamina C u leukocitima i brzi pad koncentracije vitamina C u plazmi i leukocitima tijekom stresa i infekcije su dokaz da vitamin C igra ulogu u imunološkoj funkciji. Deseci istraživanja i kliničkih ispitivanja provedeni su u pokušajima da se razjasni uloga vitamina C u običnoj prehladi i drugim virusnim i bakterijskim infekcijama; većina recenzenata literature slaže se da postoji malo opravdanja za rutinsku profilaksu velikim dozama vitamina C. Međutim, u određenim visokorizičnim populacijama, suplementacija vitaminom C može pružiti neke koristi. Ultramaratonci su podložni infekcijama gornjih dišnih puteva neposredno nakon trčanja. U dvostruko-slijepom, placebo-kontroliranom ispitivanju, suplementacija vitaminom C (600 mg dan⁻¹) koja je počela 21 dan prije starta utrke, smanjila je za 50% incidenciju infekcija gornjih dišnih puteva kod trkača. U istoj studiji, na incidenciju infekcija gornjeg dišnog trakta kod sjedilačkih kontrolnih osoba dodatak vitamina C nije imao utjecaj, iako je trajanje simptoma bilo značajno kraće (-1,4 dana) kod kontrolnih ispitanika koji su primali dodatke vitamina C. Tri od četiri randomizirana, dvostruko-slijepa, placebo-kontrolirana ispitivanja koja su koristila 1-2 g vitamina C dnevno izvijestila su o značajnom smanjenju incidencije infekcija dišnog sustava među vojnim osobljem. Manje doze, 300 mg dan⁻¹, nisu bile povezane sa smanjenjem infekcija obične prehlade među vojnim regrutima; ali je zabilježeno smanjenje od 50% kod najtežih respiratornih infekcija. Zabilježeno je da su stariji pacijenti hospitalizirani s akutnim respiratornim infekcijama koji su primali 200 mg vitamina C dnevno bili bolje od pacijenata koji su primali placebo. Iako razlika nije bila statistički značajna, stariji pacijenti koji su primali placebo imali su pet puta veću vjerojatnost da će umrijeti od komplikacija infekcije dišnog sustava nego pacijenti koji su primali dodatak askorbata. Vitamin C također može ubrzati destrukciju histamina, medijatora simptoma alergije i prehlade. Dodatak vitamina C smanjuje koncentraciju histamina u krvi od 30% do 40% kod odraslih osoba, a akutne doze vitamina C (npr. 2 g) smanjuju bronhijalnu reakciju na inhalirani

histamin kod pacijenata s alergijama. Nekoliko je istraživača sugeriralo da antihistaminski učinak vitamina C može neizravno poboljšati imunološki odgovor, to jest, askorbinska kiselina pojačava blastogenezu limfocita ovisnu o mitogenu inhibicijom proizvodnje histamina u kulturama stanica slezene. Osim toga, suplementacija s 250 mg vitamina C dnevno tijekom 6 tjedana značajno smanjuje ekspresiju ICAM-1 mRNA monocita (-50%) kod zdravih muških ispitanika, što je važno opažanje jer je ekspresija ove molekule povezana s hiperreakтивношću dišnih puteva karakterističnom za prehladu, alergijsku astmu i sezonski alergijski rinitis.⁵

Budući da vitamin C sudjeluje u sintezi kolagena, koristi se i kod bržeg zacjeljivanja rana u dozama 500-1000 mg dnevno. Kao što je spomenuto, mehanizmi koji povezuju unos askorbinske kiseline s vezivnom regulacijom i taloženjem povezani su s njezinom ulogom enzimskog kofaktora (i stabilizirajućeg faktora) za prolil i lizil hidrosilaze. Askorbinska kiselina povećava nakupljanje kolagena i aktivnost alkalne fosfataze u osteogenim stanicama, čime utječe na formiranje kostiju. Abnormalni razvoj kostiju i prijelomi primjećuju se kod skorbuta, ali je uloga vitamina C u zaštiti od gubitka koštane mase uzrokovanog starenjem manje jasna. Vitamin C iz prehrane nije dosljedno povezan s mineralnom gustoćom kostiju kod žena u postmenopauzi, ali vitamin C u prehrani, kao i konzumacija voća i povrća, štiti od gubitka koštane mase kod mladih žena i žena u ranoj menopauzi. Međutim, dugotrajno uzimanje vitamina C (400-750 mg dan⁻¹ tijekom >10 godina) pozitivno je povezano s mineralnom gustoćom kostiju kod žena u postmenopauzi. U populaciji s rizikom od prijeloma kuka (pušačice u dobi od 40 do 76 godina), nizak unos vitamina C u prehrani bio je povezan s trostruko većim rizikom od prijeloma kuka u usporedbi sa ženama nepušačicama; pušači koji unose dovoljno vitamina C u prehrani (>67 mg dnevno) nisu bili izloženi povećanom riziku od prijeloma kuka.⁵

Antioksidacijska svojstva vitamina C pomažu u zaštiti tijela od štetnih učinaka prevelike količine slobodnih radikala koji mogu oštetiti zdrave stanice. Upravo zbog tog svojstva važan je u prevenciji ateroskleroze. Epidemiološke studije su pokazale da je smrt uzrokovana kardiovaskularnim bolestima obrnuto proporcionalna redovitom korištenju dodataka vitamina C. Pojedinci koji su sudjelovali u studiji smrtnosti s koncentracijama askorbinske kiseline u serumu koje su zasitile tkivo ($\geq 62 \mu\text{mol l}^{-1}$), imali su 34% manju vjerojatnost smrti od kardiovaskularnih bolesti. Muškarci s nedostatkom vitamina C (vitamin C u plazmi $< 11 \mu\text{mol l}^{-1}$) bili su izloženi značajno povećanom riziku od infarkta miokarda nakon kontroliranja potencijalno zbunjujućih varijabli. Srednja koncentracija vitamina C u plazmi muških pacijenata primljenih unutar prvih 12 sati od početka akutnog infarkta miokarda bila je značajno niža nego kod kontrolnih ispitanika (19,5 odnosno 37,0 $\mu\text{mol l}^{-1}$).⁵ Postoje neki dokazi da veće doze vitamina povećavaju cirkulirajuće razine lipoproteina čime se sprječava taloženje kolesterola u arterijama i smanjuje rizik od koronarne bolesti srca.¹⁰ Oksidacija lipoproteina niske gustoće (LDL) povezana je s etiologijom ateroskleroze uz endotelnu disfunkciju i upalne procese. Vitamin C može biti uključen u recikliranje vitamina E, koji zauzvrat može donirati elektrone za sprječavanje oksidacije LDL-a ili poboljšati vaskularno zdravlje promicanjem endotelne sinteze dušikovog oksida ili smanjenjem krvnog tlaka kod hipertenzivnih pacijenata. Međutim, kao što je ranije opisano, klinička ispitivanja

suplementacije askorbata, bilo samog ili s drugim antioksidativnim vitaminima, tek trebaju dati značajna smanjenja rizika od kardiovaskularnih bolesti ili kliničkih događaja koji pokazuju da je askorbinska kiselina doista neovisni čimbenik u zaštiti od kardiovaskularnih rizika. Još je mnogo toga potrebno da se razjasne mehanizmi koji bi na kraju mogli dovesti do razumijevanja zašto rezultati određenih studija ukazuju na određenu razinu učinkovitosti.⁵

Epidemiološke studije su također pokazale da je rizik od katarakte (mrene) znatno veći kod pojedinaca s umjerenom do niskom koncentracijom vitamina C u krvi. Nakon kontrole potencijalno zbunjujućih varijabli, uključujući dijabetes, pušenje, izlaganje sunčevoj svjetlosti i redovitu upotrebu aspirina, uzimanje dodataka vitamina C ~10 godina bilo je povezano sa smanjenim rizikom zamućenja leće u ranoj i srednjoj dobi kod žena. U zasebnoj studiji, visok unos vitamina C u prehrani ($>200 \text{ mg dan}^{-1}$) bio je povezan s 30% smanjenjenim rizikom od katarakte, a koncentracije askorbinske kiseline u serumu $>49 \mu\text{mol l}^{-1}$ bile su povezane sa 60-70% smanjenjem od svih vrsta katarakte. Zanimljivo je da je visokokvalitetna prehrana bogata voćem, povrćem i cjelovitim žitaricama povezana sa smanjenom pojavom katarakte kod onih koji ne uzimaju dodatke vitamina C, ali ne i kod korisnika dodataka vitamina C, što ukazuje na važnu ulogu vitamina C u prevenciji katarakte.⁵

Zajedno s vitaminom A i vitaminom E čini trio antioksidativnih vitamina za koje se sada vjeruje da imaju preventivni učinak na degenerativne bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti i rak.⁴ Mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, ali smatra se da vitamin C neutralizira slobodne radikale koji uništavaju DNK i dovode do razvitka tumora ili da djeluje prooksidativno, čime se stvaraju slobodni radikali koji uništavaju tumorske stanice u samom začetku. U epidemiološkim studijama, incidencija svih uzroka raka i smrti izgledaju obrnuto povezani s koncentracijama vitamina C u serumu kod muškaraca, ali ne i kod žena. Rizik od fatalnog raka pluća bio je obrnuto proporcionalan serumskom vitaminu C i kod muškaraca i kod žena. Redovita uporaba dodataka vitamina C povezana je sa smanjenim rizikom od raka želuca i crijeva u velikim skupinama u SAD-u; ipak, kratkoročno, intervencijsko ispitivanje u kineskoj populaciji s visokim rizikom od raka želuca nije pokazalo korist suplementacije vitaminom C (120 mg dan^{-1}) na učestalost raka želuca. Kemopreventivna svojstva vitamina C mogu se povezati s antioksidativnim učincima koji štite od oksidativnog oštećenja DNK ili sa zaštitnim učincima protiv kancerogenih mehanizama koji remete stanični ciklus. Iako prooksidativni učinci askorbinske kiseline in vitro ukazuju na moguću ulogu vitamina C u mutagenizi, istraživanja koja koriste fiziološki relevantne sustave staničnih kultura pokazuju da je vitamin C najčešće povezan sa smanjenom učestalošću mutacija DNK.⁵

Rizik od moždanog udara, i cerebralnog infarkta i hemoragičnog moždanog udara, obrnuto je povezan sa statusom vitamina C. U dvije velike prospektivne studije u Finskoj i Japanu, serumski vitamin C ($>45 \mu\text{mol l}^{-1}$) bio je povezan s 30-50% manjim rizikom od moždanog udara. Međutim, redovita uporaba dodataka vitamina C nije bila povezana sa smanjenim rizikom od moždanog udara što sugerira da bi drugi čimbenici u voću i povrću mogli biti odgovorni za blagotvorne učinke prehrane bogate vitaminom C.⁵

Vitamin C ima protuupalna, imunomodulirajuća, antioksidacijska i antivirusna svojstva koja su otvorila novi prozor za njegovu potencijalnu upotrebu u liječenju i prognozi COVIDa-19. Nedavne studije o ulozi vitamina C u prognozi, prevenciji i infekciji COVID-19 su obećavajuće, ali još nije jasno može li vitamin C pomoći.³³

2.8.2. Prehrambena industrija

Osim vrlo velike upotrebe u farmaceutskoj industriji, često je korišten kao aditiv u hrani (E300). Povećava nutritivnu vrijednost namirnica, koristi se kao konzervans i antioksidans odnosno sprječava kvarenje hrane i pića uzrokovano kisikom u zraku, za povećanje kiselosti te kao stabilizator.^{4,10}

2.8.3. Kemijska industrija

U kemijskoj se industriji koristi u polimerizaciji, tehnologiji metala te pri razvijanju i printanju fotografija zbog svojih redukcijskih svojstva.¹⁰

2.8.4. Kozmetička industrija

Poznato je nekoliko prednosti lokalne primjene askorbinske kiseline. Međutim, zbog stabilnosti u vodenim sustavima, kozmetička industrija sve do posljednjih godina nije iskorištavala ove prednosti u većem opsegu. Neki derivati vitamina C imaju prednost jer su stabilni u kozmetičkim formulacijama i ispoljavaju povoljne učinke vitamina C kada se nanose na kožu. Najčešće se koriste soli askorbinske kiseline: natrijev ili magnezijev askorbat, natrijev ili magnezijev askorbil fosfat, askorbil glukozid i askorbil palmitat. Jedan od najkorisnijih je natrijev askorbil fosfat (SAP). To je bijeli prah, lako topiv u vodi do koncentracije od 50%. Za razliku od askorbinske kiseline, SAP je stabilan u vodenim otopinama pri pH iznad 6,5. Može se koristiti u proizvodima za njegu kože kako bi se spriječilo stvaranje slobodnih radikala i povećala čvrstoća kože. Kožni fibroblasti sintetiziraju manje kolagena kako stare pa redovito tretiranje kože s 3% SAP-om dovodi do znatno čvršće kože. Djeluje na posvjetljivanje kože te sprječava i ublažava staračke pjege. Također, SAP je idealan u kombinaciji s acetatom vitamina E za poboljšanje zaštite u proizvodima za njegu od sunca. Rezultati pokazuju da SAP u kombinaciji s acetatom vitamina E smanjuje stvaranje slobodnih radikala u koži za gotovo 50% u usporedbi s placebo formulacijom za zaštitu od sunca koja ima SPF 8. SAP je idealan sastojak u pasta za zube jer inhibira rast nekoliko oralnih bakterija, koje uzrokuju karijes, gingivitis i paradentozu.⁴

2.8.5. Sport

Što se tiče sportskog života, potrebno nam je više energije tijekom sportske aktivnosti. Stoga mora se oksidirati više hrane. Posljedično, moramo udisati više kisika. To implicira da će više molekula kisika pobjeći u našim tijelima. Stoga će “oksidativni stres” biti u porastu u našim tijelima. Jasno je da je obrana od ove situacije unos veće dnevne doze vitamina C. Teško je predvidjeti koju dozu uzimati jer ovisi o intenzitetu i duljini treninga.³⁴

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Provedena je infracrvena spektroskopija Fourierove transformacije na uređaju Perkin Elmer *Spectrum One FT-IR Spectrometer* (slika 12) koji se nalazi u Zavodu za fiziku Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu.



Slika 12. Perkin Elmer *Spectrum One FT-IR Spectrometer*

Analizirano je 5 različitih uzoraka čiji su naziv i sastav navedeni u nastavku:

Uzorak 1

Naziv: prah Vitamin C

Proizvođač: Poljo-Evelin d.o.o.

Sastojci: L-askorbinska kiselina

Uzorak 2

Naziv: tablete Plivit C 500 mg

Proizvođač: Pliva

Sastojci: askorbatna kiselina (500 mg), pomoćne tvari: kukuruzni škrob, talk, mikrokristalinična celuloza, magnezijev stearat

Uzorak 3

Naziv: tablete C 500 + SR Rose Hips & Bioflavonoids

Proizvođač: KAL

Sastojci: vitamin C, šipak, bioflavonoidi, emulgatori: celuloza, magnezijev stearat, stabilizator stearinska kiselina, tvar za sprječavanje zgrudnjavanja silicijev dioksid

Uzorak 4

Naziv: šumeće tablete Željezo + Vitamin C

Proizvođač: Naturel

Sastojci: šećer, kiselina (limunska kiselina), regulator kiselosti (natrijev-hodrogen-karbonat), aroma (crvena naranča), L-askorbinska kiselina, sladila (natrijev ciklamat i natrijev saharinat), željezo-pirofosfat, bojilo (crvena, natrijev riboflavin-5'-fosfat)

Uzorak 5

Naziv: tablete ABC Plus Ultra

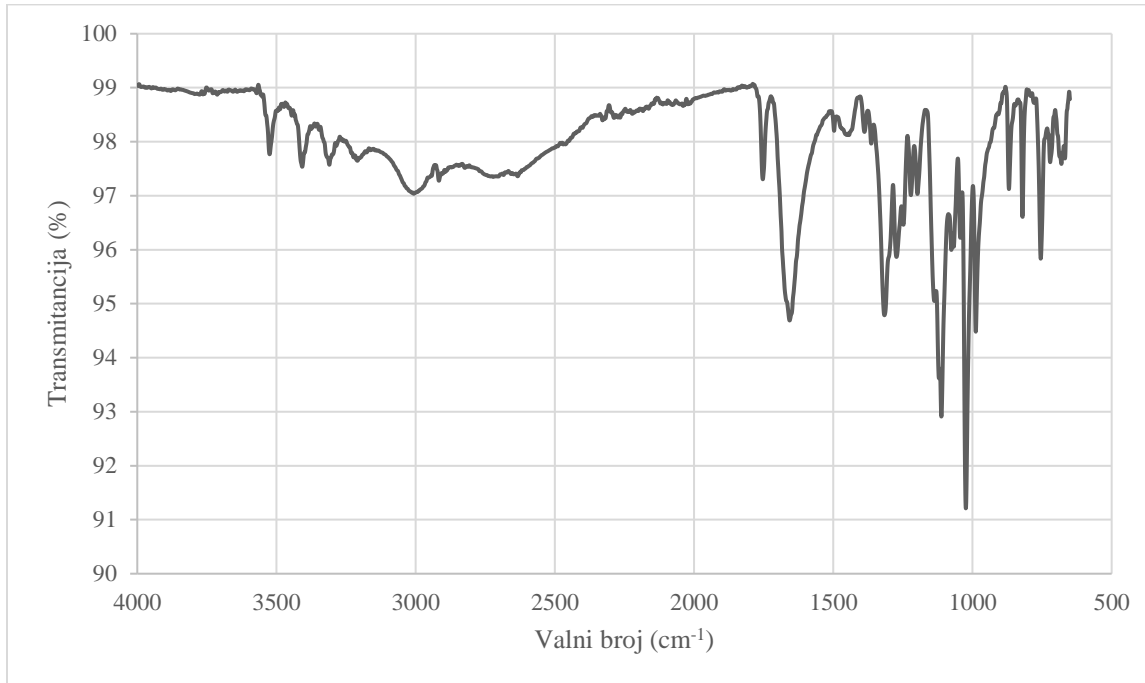
Proizvođač: Natural Wealth

Sastojci: dikalcijev fostat, tvar za povećanje volumena - mikrokristalinična celuloza; magnezijev oksid, kalijev citrat, L-askorbinska kiselina, stabilizator - umrežena natrijeva karboksimetil celuloza; tvar protiv zgrudnjavanja - masne kiseline; bioflavonoidi iz ploda citrusa (*Citrus spp.*), pivski kvasac, nikotinska kiselina, željezov fumarat, tvar protiv zgrudnjavanja - silicijev dioksid; D- α -tokoferil sukcinat, kolin bitartarat, manganov glukonat, kalcijev D-pantotemat, cinkov oksid, D-biotin, tvar protiv zgrudnjavanja – magnezijeve soli masnih kiselina; učvršćivač – polivinilpirolidon; natrijev molibdat, beta-karoten, kvasac obogaćen selenom, kromov klorid, inozitol, plod šipka (*Rosa canina*), celulozna ovojnica (natrijeva karboksimetil celuloza, glicerol, natrijev citrat dihidrat, tvar za poliranje – karnauba vosak), kalijev jodid, piridoksin-hidroklorid, pteroilmonoglutaminska (folna) kiselina, tiamin-hidroklorid, rutin iz japanske sofore (*Sophora japonica*), pčelinji propolis, PABA, kolekalciferol, riboflavin, bakrov oksid, koncentrat matične mliječi (3,5:1), cijanokobalamin

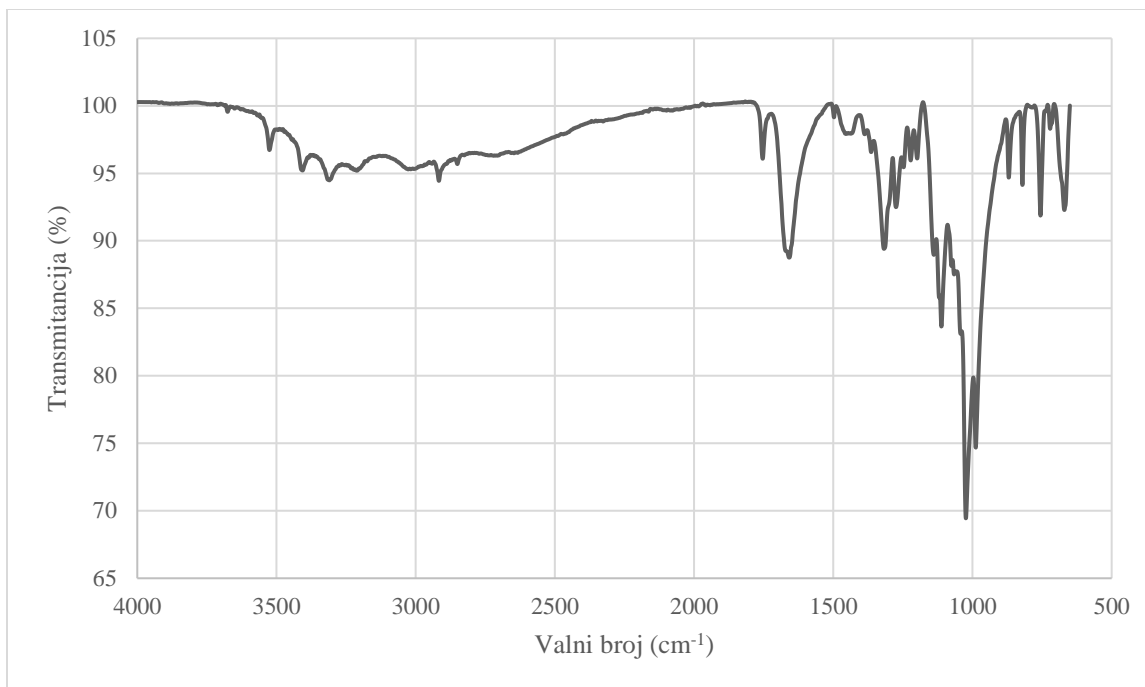
Izračunat je i infracrveni spektar molekule askorbinske kiseline u programskom paketu Gaussian 16, s funkcionalom gustoće B3LYP i baznim skupom funkcija 6-311G++(d,p).

4. REZULTATI

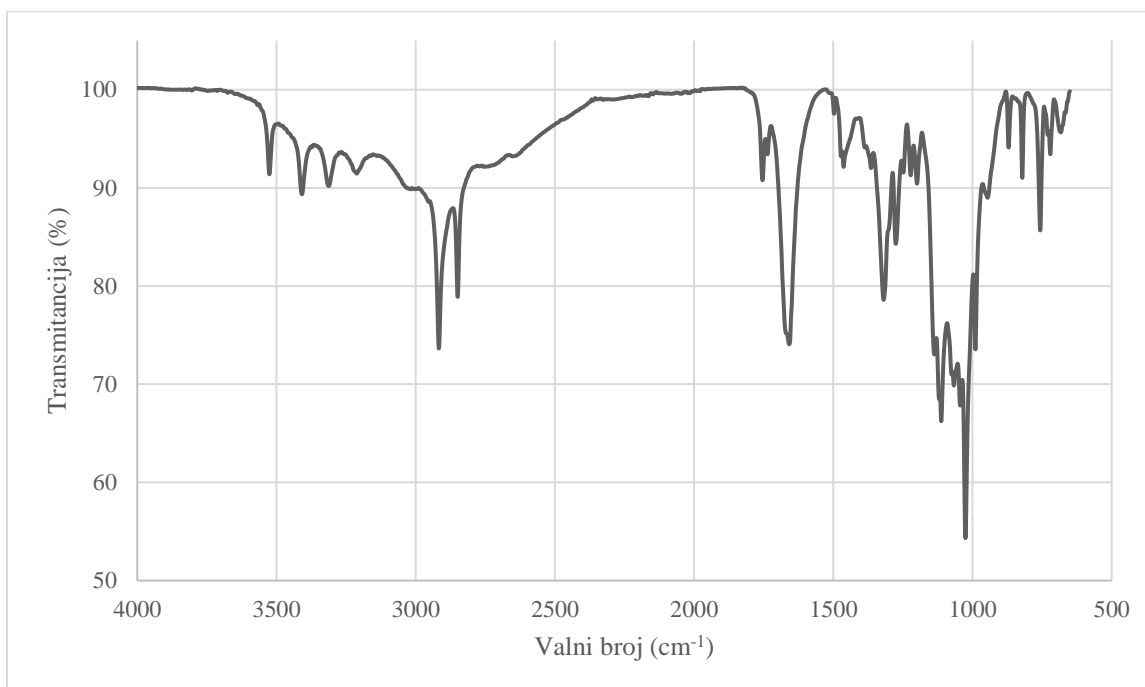
Nakon nekoliko sekundi analize svakog uzorka na spektrometru (manje od 30 sekundi) dobiveni su sljedeći grafički prikazi. Na x-osi prikazan je valni broj u cm^{-1} dok se na y-osi nalazi transmitacija u %.



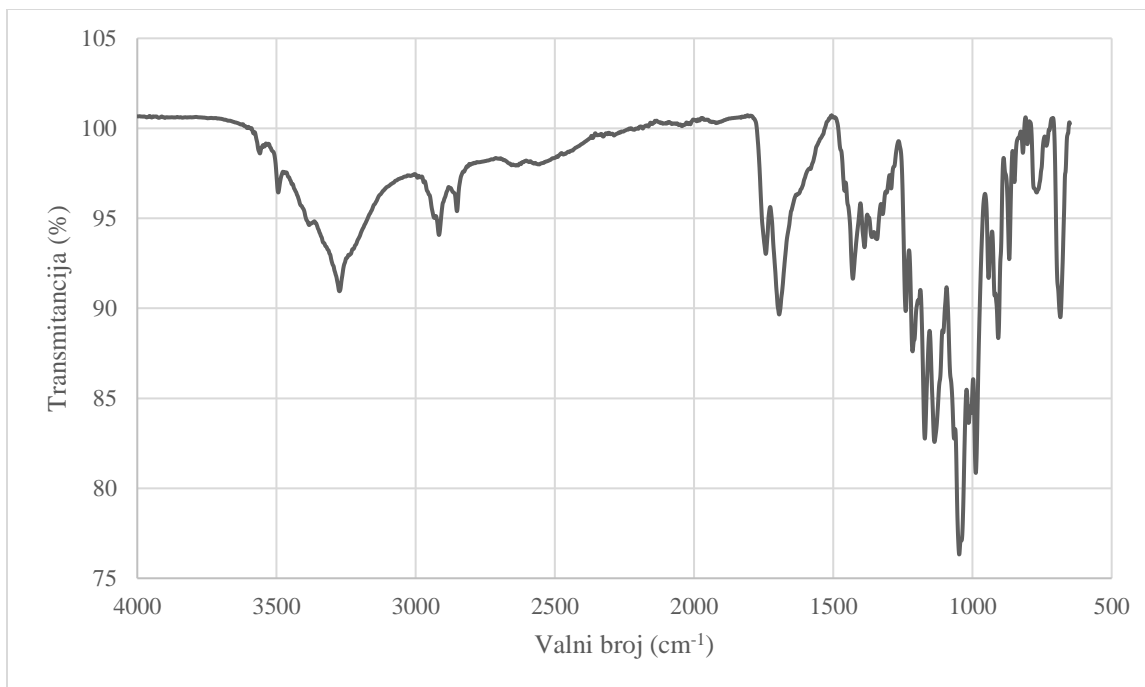
Slika 13. FTIR spektrogram uzorka 1.



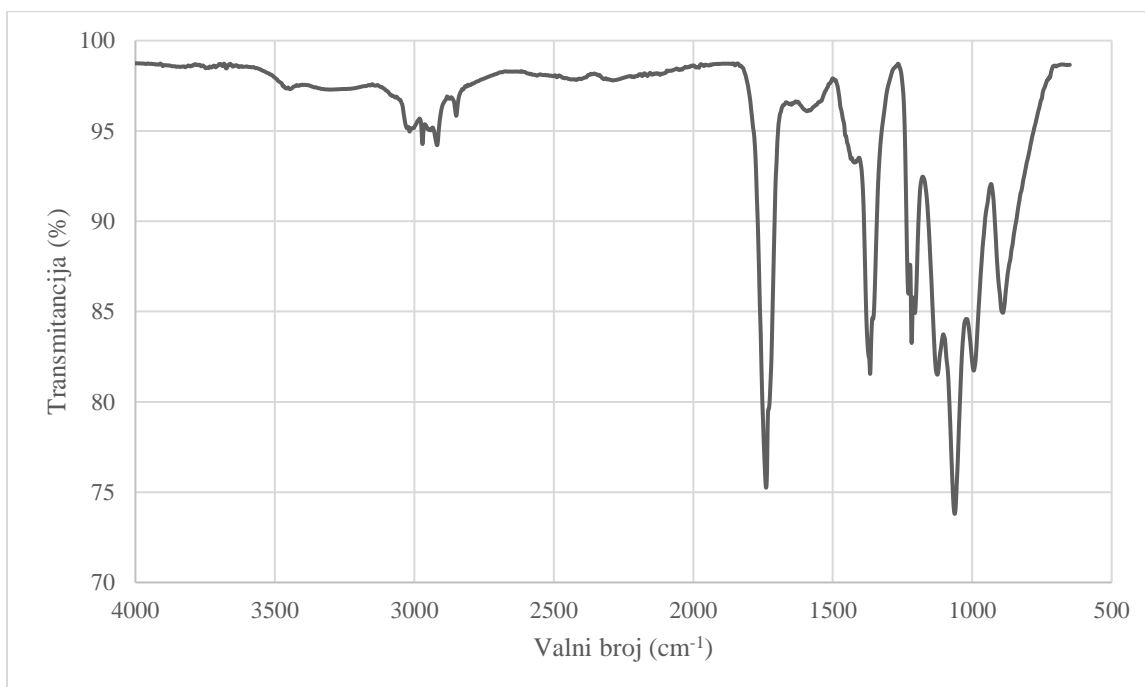
Slika 14. FTIR spektrogram uzorka 2.



Slika 15. FTIR spektrogram uzorka 3.

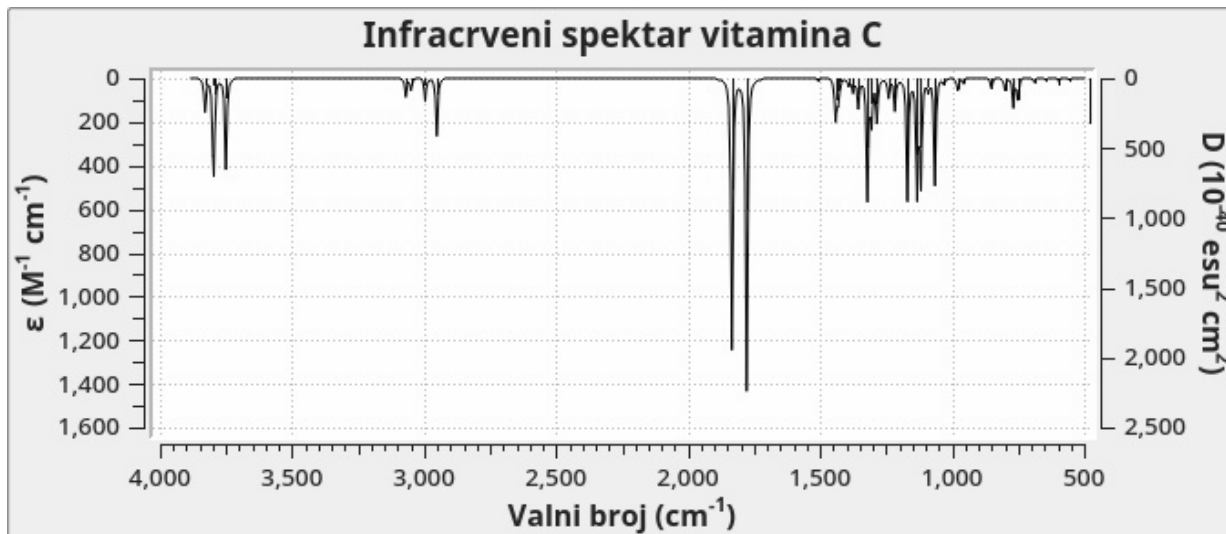


Slika 16. FTIR spektrogram uzorka 4.



Slika 17. FTIR spektrogram uzorka 5.

U programskom paketu Gaussian 16 dobiven je infracrveni spektar jedne molekule askorbinske kiseline prikazan na slici 18. Na x-osi prikazan je valni broj u cm^{-1} , a na y-osi molarni apsorpcijski koeficijent u $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (intrinzično svojstvo koliko jako kemijska vrsta apsorbira svjetlost na danoj valnoj duljini) te dipolna snaga u $10^{-40} \text{esu}^2 \text{cm}^2$ (apsolutni kvadrat vektora momenta prijelaza električnog dipola (μ)).



Slika 18. Izračunati infracrveni spektar molekule askorbinske kiseline.

5. RASPRAVA

Na grafičkom prikazu FTIR spektrograma čistog uzorka vitamina C (slika 11) vide se sljedeći karakteristični pikovi. U području od oko 3525 do 3207 cm^{-1} vide se 4 pika rastezanja O-H veza od kojih prvi pik predstavlja primarni alkohol na C6. Širi pik pri 3000 cm^{-1} nastaje zbog rastezanja C-H skupine. Rastezanje karbonilne skupine, C=O, vidi se pri 1754 cm^{-1} dok veći pik pokraj pri 1658 cm^{-1} predstavlja rastezanje dvostruke veze između ugljikovih atoma unutar prstena, C=C. Skupina pikova s dva glavna pika pri 1447 i 1317 cm^{-1} uzrok su svijanja C-H veza. Pik vidljiv pri 1112 cm^{-1} pripada C-O-C rastezanju dok pik pri 1024 cm^{-1} odgovara C-O-H svijanju. Rastezanje između ugljikovih atoma unutar prstena, C-C, vidljiva su pri 869 i 820 cm^{-1} . Pri 755 cm^{-1} vide se vibracije svijanja O-H veze. Možemo primijetiti da je transmitancija vrlo visoka, iznad 90%. Uzrok tome je što je ovaj uzorak bio u praškastom obliku zbog čega je analizirani sloj bio tanji od ostalih uzoraka u obliku tableta, a apsorbancija je proporcionalna duljini puta kroz koji prolazi zračenje; tanji sloj znači manju apsorbanciju odnosno veću transmitaciju.

U uzorku tablete Plivit C se uz askorbinsku sliku nalazi samo mala količina pomoćnih tvari pa na spektrogramu (slika 12) uočavamo iste karakteristične pikove samo malo manje oštre. Transmitancija je kod ovog uzorka manja.

Preostala tri uzorka, tablete C 500 + SR Rose Hips & Bioflavonoids, šumeće tablete Željezo + Vitamin C te tablete ABC Plus Ultra sadrže veći broj sastojaka zbog čega na spektrogramu (slika 13, 14 i 15) vidimo i neke druge, nove pikove te se može primijetiti i preklapanje/spajanje pikova u jedan širi pik.

Izračunate frekvencije su nešto više od izmjerenih jer u stvarnom uzorku nema slobodne molekule, zbog čega se na izračunatom infracrvenom spektru molekule askorbinske kiseline (slika 16) pikovi javljaju pri nešto većim valnim brojevima.

6. ZAKLJUČAK

Vitamin C kao i svi ostali vitamini potreban nam je kao nutrijent za održavanje zdravlja. Naziva se askorbinska kiselina jer nedostatak uzrokuje bolest skorbut kod ljudi, što rezultira nizom patoloških simptoma. Slaba je dvoprotonska kiselina koja ima jaka reducirajuća svojstva. Najvažnije kemijsko svojstvo vitamina C je reverzibilna oksidacija askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu koja zadržava aktivnost vitamina. Ova mala molekula ima brojne funkcije. Jedna je od najvažnijih redoks kofaktora u biljnim i životinjskim sustavima. Izvrstan je antioksidans te olakšava redukcijsko-oksidacijske reakcije. Sudjeluje u zaštiti drugih antioksidansa i pomaže tijelu da apsorbira željezo. Štiti lipide, DNK i proteine od oksidansa. Djeluje u mnogim mono- i dioksigenazama za održavanje metala u reduciranom stanju. Ti enzimi su važni za sintezu norepinefrina, aktivaciju hormona, biosintezu karnitina te biosintezu kolagena, vezivnog tkiva i proteinskih vlakana koja daju snagu našim zubima i desnama, mišićima, krvnim žilama i koži. Ima sposobnost stvaranja relativno stabilnih slobodnih radikala te je glavna obrana stanice od oksidativnih oštećenja jer djeluje kao sakupljač slobodnih radikala. U visokim dozama kao i u aerobnim uvjetima uz prisustvo metala sposobnih za redoks može djelovati i prooksidativno. Ima ulogu u imunološkom sustavu tako što utječe na proizvodnju protutijela, povećava brzinu stvaranja limfocita i povećava mobilnost leukocita pa pomaže u borbi protiv infekcije. Također može inaktivirati i neutralizirati histamin koji aktivira upalni odgovor. U biljkama vitamin C je neophodan je za ispravno odvijanje fotosinteze te je uključen u različite faze rasta i razvoja biljaka, kao što su sazrijevanje i klijanje sjemena, cvjetanje, sazrijevanje plodova i starenje. Zbog navedenih funkcija vitamin C ima brojne primjene u medicini te prehrambenoj, kemijskoj i kozmetičkoj industriji. Primjer je hranjive tvari koju ljudi ne mogu proizvesti, ali mnoge druge životinje mogu. Odraslim ljudima dnevno je potrebno 75–90 mg vitamina C, a možemo ga unijeti kroz razno voće i povrće. Glavna mjesta apsorpcije askorbinske kiseline su ileum i jejunum. Kod doza od 500 mg i viših ne dolazi do potpune apsorpcije, a velik dio apsorbirane doze se ne metabolizira i izlučuje urinom. Prenosi se u sve vrste stanica difuzijom i pomoću transportnih proteina. Glavni metaboliti katabolizma askorbinske kiseline u organizmu su dehidroaskorbinska kiselina, 2,3-diketo-gulonska kiselina i oksalna kiselina. Metabolizira se najvećim dijelom u jetri, a metaboliti se izlučuju urinom. Pušači, trudnice, alkoholičari, i dr. imaju povećane potrebe za vitaminom C koje mogu zadovoljiti dodacima prehrani. Reichsteinova metoda sinteze iz glukoze još uvijek predstavlja temelj procesa za proizvodnju, a u industriji se danas koristi biokemijski proces fermentacije u dva koraka koji se i dalje nastoji unaprijediti. Važnost vitamina C potvrđuje činjenica da se godišnje proizvodi približno 80.000 tona sa svjetskim tržištem većim od 600 milijuna dolara. Dostupne su brojne analitičke metode za opis vitamina C od kojih je u ovom radu korištena infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom. FTIR spektrogram vitamina C pokazuje karakteristične pikove rastezanja O-H veza, C-H skupine, karbonilne skupine, dvostruke veze između ugljikovih atoma unutar prstena, C-O-C veze i ugljikovih atoma unutar prstena te svijanja C-H veza, C-O-H i O-H veza. Deblji sloj analiziranog uzorka rezultira većom apsorbancijom odnosno manjom transmitancijom. Što je veći broj drugih sastojaka u uzorku teže je uočiti karakteristične pikove za vitamin C. Unatoč brojnim spoznajama o askorbinskoj kiselini, postoje funkcije i mehanizmi djelovanja, pogotovo u biljkama, koji još uvijek nisu u potpunosti objašnjeni zbog čega je ovaj vitamin još uvijek predmet raznih istraživanja.

7. POPIS SIMBOLA

H_2Asc askorbinska kiselina

$HAsc^-$ askorbatni monoanion (askorbat)

Asc^{2-} askorbatni dianion

$HAsc^\bullet$ askorobil radikal

$Asc^{\bullet-}$ askorobil radikal anion

DHA dehidroaskorbinska kiselina

BDHA dehidroaskorbinska kiselina dimer

8. LITERATURA

- ¹W. B. Grant, Vitamins and Minerals u: B. D. Roitberg, Reference Module in Life Sciences, SAD, Elsevier Inc., (2017) 1,2
- ²Vitamin and mineral requirements in human nutrition, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004., 340-341
- ³J. H. Block, Vitamins u: Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, SAD, John Wiley & Sons, 5 (2007) 1-4
- ⁴C. Casas Vitamins u: A. Salvador, A. Chisvert, Analysis of Cosmetic Products, USA, Elsevier Inc., 1 (2007) 364-379
- ⁵C.S. Johnston, F. M. Steinberg, R. B. Rucker, Ascorbic Acid u: J. Zempleni, J. W. Suttie, J. F. Gregory III, P. J. Stover, Handbook of Vitamins, SAD, CRC Press, 4 (2013) 490-510
- ⁶<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54670067> (pristup 09.10.2022.)
- ⁷https://iupac.org/wp-content/uploads/2021/06/Organic-Brief-Guide-brochure_v1.1_June2021.pdf (pristup 09.10.2022.)
- ⁸J. Hvoslef, The crystal structure of L-ascorbic acid, "vitamin C" I. The X-ray analysis, Acta Crystallographica, B 24(1) (1968) 23-35.
- ⁹F. M. Steinberg, R. B. Rucker, Vitamin C u: W. J. Lennarz, M. D. Lane, Encyclopedia of Biological Chemistry, SAD, Elsevier Inc., 2 (2013) 530-534
- ¹⁰M. B. Davies, J. Austin, D. A. Partridge, Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry, The Royal Society of Chemistry, UK, 1991., str. 1-110
- ¹¹B. Halliwell, M. Whiteman, Antioxidant and prooxidant properties of vitamin C u: M. Dekker, Vitamin C in Health and Disease, SAD, CRC Press, 5 (1997) 25-94
- ¹²B.H.J. Bielski, Chemistry of ascorbic acid radicals u: P.A. Seib, B.M. Tolbert, Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses. Advances in Chemistry Series, SAD, Am. Chem. Soc., 200 (1982) 81-100
- ¹³B.H.J. Bielski, A.O. Allen, H.A. Schwarz, Mechanism of disproportionation of ascorbate radicals, J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 3516-3518
- ¹⁴B. Halliwell, How to characterize a biological antioxidant, Free Rad. Res. Comms., 9 (1989) 1-32
- ¹⁵I. M. C. M. Rietjens, M. G. Boersma, L. de Haan, B. Spenkelink, H. M. Awad, N. H. P. Cnubben, J. J. van Zanden, H. van der Woude, G. M. Alink, J. H. Koeman, The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, Environ. Toxicol. Pharmacol., 11 (2002) 321-333

- ¹⁶A. Samuni, J. Aronovitch, D. Godinger, M. Chevion, G. Czapski, On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions, *Eur. J. Biochem.*, 137 (1983) 119-124
- ¹⁷H. Asard, J. May, N. Smirnoff, *Vitamin C: Function and Biochemistry in Animals and Plants*, BIOS Scientific Publishers, New York, 2004., str. 155-164
- ¹⁸K. J. Carpenter, The Discovery of Vitamin C, *Annals of Nutrition & Metabolism* 61 (2012) 259-264
- ¹⁹H. Padh, Vitamin C: Newer Insights into Its Biochemical Functions, *Nutrition reviews*, 49 3 (1991) 65-70
- ²⁰<https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes/> (pristup 12.10.2022.)
- ²¹C. Paciolla, S. Fortunato, N. Dipierro, A. Paradiso, S. De Leonardis, L. Mastropasqua, M. Concetta de Pinto Vitamin C in Plants: From Functions to Biofortification, *Antioxidants* 8 519 (2019) 4-6
- ²²https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Vitamin_C.html#_ref-68/ (pristup 20.10.2022.)
- ²³Reichstein T, Grüssner A. Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin), *Helv. Chim. Acta*, 17 (1934) 311-328
- ²⁴T.C. Crawford, Synthesis of L-ascorbic acid u: F.A. Seib, B.M. Tolbert, *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses. Advances in Chemistry Series, SAD, Am. Chem. Soc.*, 200 (1982) 1-36
- ²⁵M. Levine, I. Ebeonuwa, P.-C. Violet, Vitamin C u: A. S. Prasad and G. J. Brewer, *Essential and Toxic Trace Elements and Vitamins in Human Health, SAD, Elsevier Inc.*, 17 (2020) 242-246
- ²⁶<https://ihsmarkit.com/products/chemical-technology-pep-reviews-ascorbic-acid-2002.html> (pristup 20.10.2022.)
- ²⁷M. Eggersdorfer, D. Laudert, U. Létinois, T. McClymont, J. Medlock, T. Netscher, W. Bonrath, One Hundred Years of Vitamins—A Success Story of the Natural Sciences, *Angew. Chem. Int.* 51 (2012) 12965-12967
- ²⁸V.A. Dickinson, G. Block, E. Russek-Cohen, Supplement use, other dietary and demographic variables, and serum vitamin C in NHANES II, *J. Am. Coll. Nutr.*, 13 (1994) 22–32
- ²⁹S.J. Padayatt, H. Sun, Y. Wang, H.D. Riordan, S.M. Hewitt, A. Katz, R.A. Wesley, M. Levine, Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use, *Ann. Intern. Med.*, 140 (2004) 533–537
- ³⁰J.X. Wilson, Regulation of vitamin C transport, *Annu. Rev. Nutr.*, 25 (2005) 105–125.
- ³¹<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ftir-spectroscopy>

³²<https://www.agilent.com/en/support/molecular-spectroscopy/ftir-spectroscopy/ftir-spectroscopy-basics-faqs>

³³R.S. Neethu, M.V.N. Janardhan Reddy, S. Batra, S. Kumar Srivastava, K. Syal, Vitamin C and its therapeutic potential in the management of COVID19, Clinical Nutrition ESPEN 50 (2022) 8-14

³⁴<http://real.mtak.hu/140783/1/2022.12.1.1%20-%20Sport%20and%20Vitamin%20C.pdf>
(pristup 29.10.2022.)